

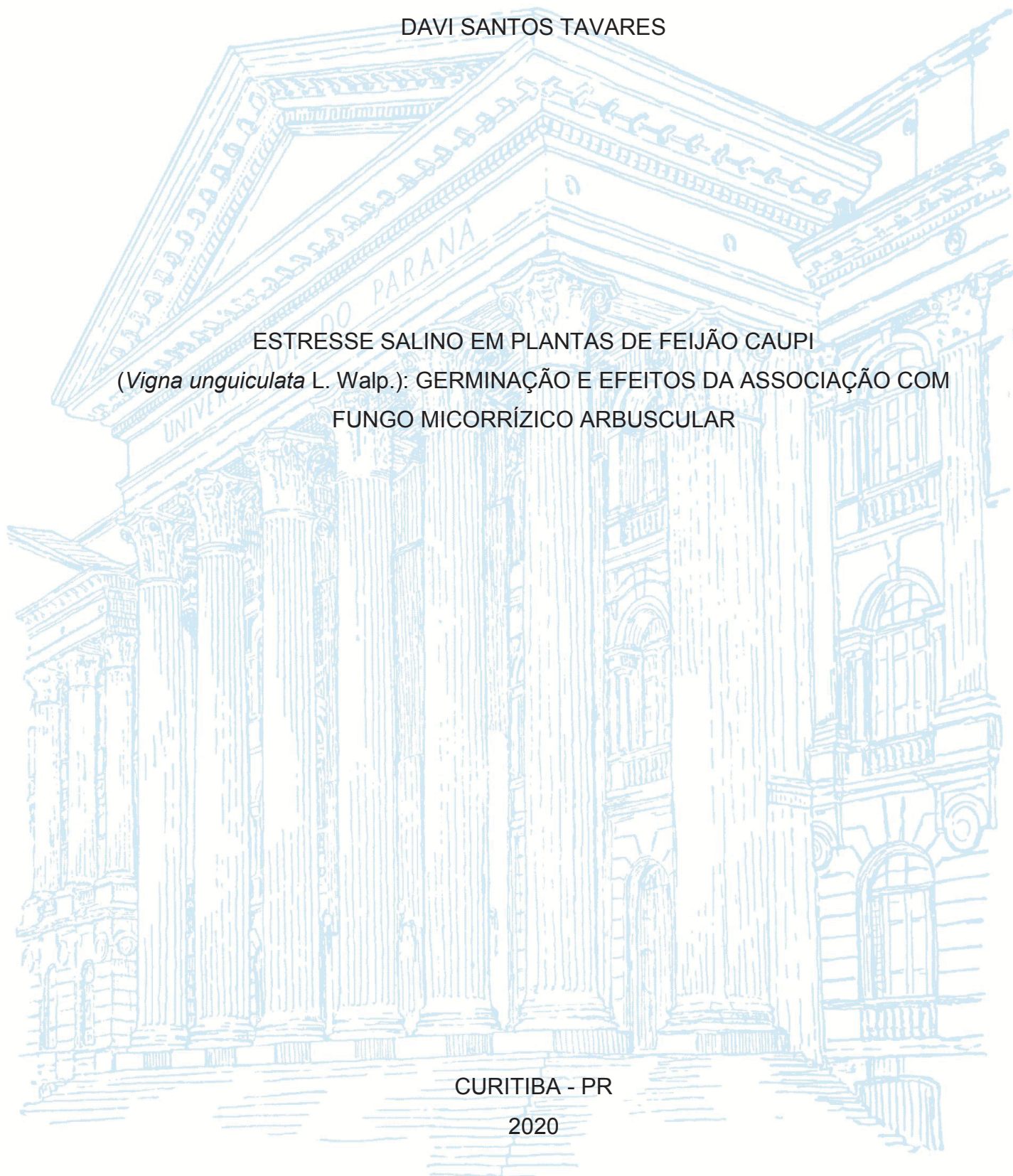
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DAVI SANTOS TAVARES

ESTRESSE SALINO EM PLANTAS DE FEIJÃO CAUPI  
(*Vigna unguiculata* L. Walp.): GERMINAÇÃO E EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO COM  
FUNGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR

CURITIBA - PR

2020



DAVI SANTOS TAVARES

ESTRESSE SALINO EM PLANTAS DE FEIJÃO CAUPI  
(*Vigna unguiculata* L. Walp.): GERMINAÇÃO E EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO COM  
FUNGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Área de concentração Solo e Ambiente, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência do Solo.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Pedrosa Gomes

Coorientador: Prof. Dr. Bruno Francisco Sant'Anna Santos

CURITIBA - PR

2020

Tavares, Davi Santos

Estresse salino em plantas de Feijão Caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.): germinação e efeitos da associação com fungo micorrízico arbuscular / Davi Santos Tavares. - Curitiba, 2020.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências do Solo.

Orientador: Marcelo Pedrosa Gomes

Coorientador: Bruno Francisco Sant'anna Santos

1. Produção agrícola. 2. Salinidade. 3. Segurança alimentar. I. Gomes, Marcelo Pedrosa. II. Santos, Bruno Francisco Sant'anna. III. Título. IV. Universidade Federal do Paraná.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIA DO SOLO -  
40001016014P4

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA DO SOLO da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **DAVI SANTOS TAVARES** intitulada: **ESTRESSE SALINO EM PLANTAS DE FEIJÃO CAUPI (Vigna unguiculata L. Walp.): GERMINAÇÃO E EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO COM FUNGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR**, sob orientação do Prof. Dr. MARCELO PEDROSA GOMES, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 07 de Fevereiro de 2020.

  
MARCELO PEDROSA GOMES

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

  
NERILDE FAVARETTO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

  
PATRICIA SOFFIATTI

Avaliador Externo (DEPARTAMENTO BOTÂNICA -UFPR)

## DEDICATÓRIA

Eu venho de um lugar onde por vários motivos a força e a coragem são coisas quase que inerentes ao povo de lá (Os sertanejos). Assim, nunca me faltou exemplos de personalidades com estas características. Entretanto, quando falo aqui de Coragem e Força me refiro com mais ênfase as mulheres e homens de minha família, é a vocês que eu devo tudo, e a quem sou eternamente grato, principalmente por me ensinarem sobre a perseverança e dedicação, estes ensinamentos me fizeram chegar aqui hoje. Saibam que essa conquista é nossa.

José Bartolomeu Siqueira Tavares

Damiana Gonçalves dos Santos Tavares

Bianca Santos Tavares Galdino

Emanuela Santos Tavares

M<sup>a</sup> Rafaela Santos Tavares

Lucas dos Santos Galdino

Anna Beatriz dos Santos Galdino

M<sup>a</sup> Joaquina dos Santos Galdino

A vocês dedico!

## **AGRADECIMENTOS**

Meu maior agradecimento é para minha família, nada disso seria possível sem o suporte emocional alicerçado em nossa casa, nem, sem a gana ensinada por vocês, de tentar cada vez alçar novos e maiores voos!

Meus pais amo vocês!

Minhas irmãs Bianca, Emanuela e Rafaela, apesar da distância física vocês sempre se fizeram presentes no meu cotidiano, me acalutando e também aos nossos pais, sou eternamente grato!

As minhas avós Rosa e Adalgisa que me ensinaram sobre amor e disciplina, as minhas Tias Zuleide, Severina, Mônica, Damiana e Socorro, guerreiras que me ensinaram sobre dedicação, aos meus primos e primas Laura, Edylla, Sara e Jhonata, que carinhosamente hoje considero como irmãos. Agradeço!

Agradeço também ao meu Orientador Marcelo Pedrosa Gomes, além de professor, foi um amigo muito querido durante estes dois anos. Saiba que está personificado em ti meu ideal de educador!

A minha casa Paranaense: Ricardo, Suave, Bille, Patrick e Thiago. Bem como aos meus amigos Pernambucanos: Bianca, Idalina, Paulo, Renata e Carlinha.

E os amigos encontrados no Paraná: Lenir, Yohanne, Stallone, Jéssica, Edvaldo, Larissa e Daiane. Por todas as horas de diversão, acolhimento e terapia.

Pelos risos, abraços e choros. Agradeço!

Agradeço por fim ao Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo e a CAPES pela oportunidade de desenvolver um sonho!



Uma vez disse o homem: “provar um fruto doce oriundo da árvore a qual o mesmo homem plantou, tem o sabor do dever cumprido. Que é bem parecido com o sabor do sucesso” (TAVARES, 2011).

O mesmo homem disse tamanha beleza arraigado dos saberes desenvolvidos na sua primeira aventura atrás do conhecimento. Sua mãe que lhe incentivou a partir, dizia lhe deixar de presente o que ela mais prezava a “educação”.

A outrora jovem sábia não imaginava o tamanho da herança que deixaria!

O autor (2020)

## RESUMO

O intenso impacto antrópico no agroecossistema e o avanço do aquecimento terrestre, impulsionam o problema ambiental da salinidade. Condutividades elétricas da solução do solo acima de  $2,5 \text{ dS m}^{-1}$  podem restringir o acesso e o transporte de água e nutrientes pelas plantas, bem como, provocar estresse iônico e oxidativo. O  $\text{Na}^+$  altera a atividade de enzimas e a estrutura funcional de proteínas da planta, culminando em senescência e morte celular. Neste contexto, torna-se importante investigar o efeito da salinidade nas diferentes fases de desenvolvimento da cultura a fim de identificar mecanismos de tolerância a salinidade, bem como estudar práticas que possam minimizar o estresse salino. A inoculação de plantas com fungos micorrízicos arbusculares (FMA) tem se destacado como tecnologia para promoção da produção agrícola em áreas afetadas por sais, pois, além de propiciar uma estabilização no balanço nutricional da planta e diminuir a absorção de sódio, auxilia no desenvolvimento de uma agricultura menos impactante. O presente estudo tem por objetivo avaliar o efeito da salinidade ( $\text{NaCl}$ ) nas fases iniciais de desenvolvimento do feijão-caupi, comparar os impactos iniciais com os visualizados na produtividade de grãos, bem como investigar o efeito da inoculação de *Rhizophagus clarus*, quanto a atenuação dos efeitos deletérios decorrentes do estresse salino. Nossos resultados sugerem que testes de germinação não devem ser os únicos testes a serem utilizados a fim de determinar a tolerância a salinidade de uma cultivar, visto que a tolerância a salinidade varia entre as fases fenológicas. Sendo a avaliação em plântulas mais indicada para tal determinação. Assim como também indica que a associação da cv. BRS Imponente de *V. unguiculata* com o FMA *R. clarus* pode ser uma prática favorável ao desenvolvimento agrícola e manutenção da segurança alimentar em áreas afetadas por sais.

Palavras-chave: Salinidade. Mecanismos de tolerância. Produção agrícola. Segurança alimentar.



## ABSTRACT

The intense anthropic impact on the agroecosystem associated to the increases in the global temperature has resulted in soil salinization. Electrical conductivities of the soil solution above  $2.5 \text{ dS m}^{-1}$  can restrict the access and transport of water and nutrients to plants, as well as cause ionic and oxidative stress.  $\text{Na}^+$  alters the activity of enzymes and the functional structure of plant proteins, culminating in plant senescence and cell death. In this context, it is important to investigate the effect of salinity in the different stages of crop development in order to identify mechanisms of tolerance to salinity, as well as to study practices that can minimize salt stress. The inoculation of plants with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) has emerged as a technology for promoting agricultural production in areas affected by salts, because, in addition to providing a stabilization of plant nutritional balance, AMF can reduce the absorption of sodium. The present study aimed to evaluate the effect of salinity ( $\text{NaCl}$ ) on the germination and establishment of cowpea plants, as well as to investigate the effect of *Rhizophagus clarus* inoculation on attenuation of salt stress on plant productivity. Although seed germination was not affected by salt, seedling establishment, as well as grain yield was reduced by salinity - an indication that germination tests should not be used alone in studies of cultivar tolerance to salt stress. The deleterious effect of salt at concentrations  $\leq 50 \text{ mM}$  on plant productivity, however, was attenuated in plants inoculated with *R. clarus*. The fungus promoted positive effects on the plant's nutrition and reduced the  $\text{Na}^+$  concentrations in the plants, favoring their growth. Thus, inoculation of cv. BRS Imponente de V. unguiculata with FMA *R. clarus* should be considered as a practice favorable to agricultural development and maintenance of food security in areas affected by salts.

Keywords: Salinity. Tolerance mechanisms. Agricultural production. Alimentary security

## INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. A) Porcentagem de germinação, B) embebição (conteúdo de água) e C) tempo médio de germinação de sementes de *V. unguiculata* submetidas a diferentes potenciais osmóticos (MPa) gerados por NaCl ou PEG. Barras representam média  $\pm$  SD de quatro repetições. Em A e B, \*representa diferença significativa entre NaCl e PEG dentro do mesmo potencial osmótico e tempo de avaliação pelo teste de Contraste ( $P < 0.05$ ). Em C, letras minúsculas representam diferença entre os potenciais osmóticos dentro dos tratamentos com NaCl ou PEG, enquanto letras maiúsculas representam diferença entre os compostos dentro do mesmo potencial osmótico pelo teste de Contraste ( $P < 0.05$ ). .....26
- Figura 2. Concentrações de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), peroxidação de lipídeos (MDA), atividade de catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) em sementes de *V. unguiculata* expostas a diferentes potenciais osmóticos (MPa) gerados por NaCl ou PEG ao longo do tempo. \*representa diferença significativa entre NaCl e PEG dentro do mesmo potencial osmótico e tempo de avaliação pelo teste de Contraste ( $P < 0.05$ ). .....28
- Figura 3. Atividade das enzimas Citrato sintase, e das enzimas associadas à cadeia de transporte de elétrons mitocondrial ao longo do tempo. Complexo I (NADH: ubiquinona oxidoreductase), Complexo II (succinato desidrogenase), Complexo III (Ubiquinol-citocromo c redutase), Complexo IV (citocromo c oxidase) e Complexo V (ATP sintase) em sementes de *V. unguiculata* expostas a diferentes potenciais osmóticos gerados por NaCl ou PEG. \*representa diferença significativa entre NaCl e PEG dentro do mesmo potencial osmótico e tempo de avaliação pelo teste de Contraste ( $P < 0.05$ ). .....30
- Figura 4. Concentrações de sódio ( $Na^+$ ) em sementes de *V. unguiculata* expostas a concentrações crescentes de NaCl. Letras minúsculas representam diferença entre os potenciais osmóticos dentro do mesmo tempo de avaliação (3, 6, 9 e 12 h), enquanto letras maiúsculas representam

diferença entre os tempos de avaliação dentro do mesmo potencial osmótico pelo teste de Contraste ( $P < 0.05$ ).....	31
Figura 5. Produtividade de grãos de plantas de <i>V. unguiculata</i> cv. BRS Imponente expostas a concentrações crescentes de NaCl com e sem inoculação por <i>R. clarus</i> . As médias foram comparadas pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ). As barras significam média $\pm$ DP das repetições. * significativo a 5% e <sup>ns</sup> não significativo.....	49
Figura 6. Estruturas fúngicas (Setas indicam hifa; SF – Esporo fúngico) no interior de raízes de <i>V. unguiculata</i> cv. BRS Imponente inoculado com <i>R. clarus</i> . A – Tratamento controle (0 mM NaCl + FMA-); B, C e D – 0 mM NaCl + FMA+; E – 100 mM NaCl + FMA+). Escala de 100 $\mu$ m.....	50
Figura 7. Colonização micorrízica (%) em plantas de <i>V. unguiculata</i> cv. BRS Imponente expostas a concentrações crescentes de NaCl com e sem inoculação por <i>R. clarus</i> . Letras maiúsculas indicam diferença entre a inoculação (FMA- e FMA+) dentro das mesmas concentrações de NaCl (0, 25, 50, 75 e 100 mM), enquanto que letras minúsculas indicam diferença entre as concentrações de NaCl dentro da ausência (FMA-) e presença (FMA+) de inoculação, para interação significativa entre os fatores, para interação significativa entre os fatores, comparados pelo teste de Tukey All pairs HSD ( $p < 0,05$ ). As barras significam média $\pm$ DP de três repetições.*** significativo a 0.1% de propabilidade.....	51
Figura 8. Concentração de prolina em folhas de <i>V. unguiculata</i> cv. BRS Imponente expostas a concentrações crescentes de NaCl com e sem inoculação por <i>R. clarus</i> . Letras maiúsculas indicam diferença entre a inoculação (-FMA e +FMA) dentro das mesmas concentrações de NaCl (0, 25, 50, 75 e 100 mM), enquanto que letras minúsculas indicam diferença entre as concentrações de NaCl dentro da ausência (FMA-) e presença (FMA+) de inoculação, para interação significativa entre os fatores, comparados pelo teste de Tukey All pairs HSD ( $p < 0,05$ ). As barras significam média $\pm$ DP de três repetições. *** significativo a 0,1%.....	52
Figura 9. Cortes transversais da folha de plantas de <i>V. unguiculata</i> cv. BRS Imponente expostas a concentrações crescentes de NaCl com e sem	

inoculação por *R. clarus*. A) 0 mM de NaCl + FMA-; B) 75 mM de NaCl + FMA-; C - 25 mM de NaCl + FMA- e D: 25 mM de NaCl + FMA+. PI – Parênquima paliçádico; Sp – Parênquima lacunoso; Mt – Espessura do mesofilo e Lt – Espessura da folha. Escala de 100 µm.

.....53

Figura 10. Marcadores anatômicos. A – Espessura da folha; B – Mesófilo; C – Parênquima lacunoso; D – Parênquima paliçádico; E – Epiderme superior e D – Epiderme inferior de folhas de *V. unguiculata* cv. BRS Imponente expostas a concentrações crescentes de NaCl com e sem inoculação por *R. clarus*. Letras maiúsculas indicam diferença entre a inoculação (-FMA e +FMA) dentro das mesmas concentrações de NaCl (0, 25, 50, 75 e 100 mM), enquanto que letras minúsculas indicam diferença entre as concentrações de NaCl dentro da ausência (-FMA) e presença (+FMA) de inoculação, para interação significativa entre os fatores, comparados pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ). As barras significam média  $\pm$  DP das repetições. \* e \*\*\* significativos a 5% e a 0,1%, <sup>ns</sup> não significativo. ....54

Figura 11. Acúmulo de íons potencialmente tóxicos (Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>) e Razão Na/K em folhas de *V. unguiculata* cv. BRS Imponente expostas a concentrações crescentes de NaCl com e sem inoculação por *R. clarus*. Letras maiúsculas indicam diferença entre a inoculação (-FMA e +FMA) dentro das mesmas concentrações de NaCl (0, 25, 50, 75 e 100 mM), enquanto que letras minúsculas indicam diferença entre as concentrações de NaCl dentro da ausência (-FMA) e presença (+FMA) de inoculação, para interação significativa entre os fatores, comparados pelo teste de Tukey All pairs HSD ( $p < 0,05$ ). As barras significam média  $\pm$  DP de três repetições. . \* e \*\*\* significativo a 5% e 0,1% respectivamente, <sup>ns</sup> não significativo. Linha vermelha tracejada indica o limiar de toxicidade para a razão Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>. ....57

## INDICE DE TABELAS

- Tabela 1. MANOVA medidas repetidas para os efeitos de diferentes potenciais osmóticos (MPa) gerados por NaCl ou PEG e diferentes tempos de exposição (horas) em sementes de *Vigna unguiculata* L. Walp.....25
- Tabela 2. Altura da parte aérea e comprimento radicular de plântulas de *V. unguiculata* expostas a diferentes potenciais osmóticos gerados por NaCl ou PEG. Letras minúsculas comparam medias na linha e maiúsculas na coluna dentro de cada variável pelo teste de GLM ( $P<0.05$ ;  $n=3$ ). .....32
- Tabela 3. Produtividade de biomassa fresca e seca da parte aérea (MFPA e MSPA) e de raízes (MFR e MSR) de *V. unguiculata* cv. BRS Imponente sob diferentes concentrações de NaCl, com e sem a inoculação com *R. clarus*, expressas em g planta<sup>-1</sup>. Letras maiúsculas representam diferença entre a inoculação (FMA- e FMA+) dentro da mesma concentração salina, enquanto que letras minúsculas, indicam diferença entre as concentrações de NaCl dentro da ausência (FMA-) e presença (FMA+) de inoculação. Para interação significativa entre os fatores, comparados pelo teste de Tukey All pairs HSD ( $p<0,05$ ). 48
- Tabela 4. Acúmulo de macronutrientes, Fósforo (P); Potássio (K); Calcio (Ca); Magnésio (Mg) e Enxofre (S), em folhas de *V. unguiculata* cv. BRS Imponente sob diferentes concentrações de NaCl, com e sem a inoculação com *R. clarus* expressas em g kg de massa seca<sup>-1</sup>. Letras minúsculas indicam diferença entre as concentrações de NaCl dentro da ausência (-FMA) e presença (+FMA) de inoculação, enquanto que (\*) representa diferença entre a inoculação (-FMA e +FMA) dentro das mesmas concentrações de NaCl pelo teste t de Student ( $p<0,05$ ). ...55
- Tabela 5. Acúmulo de micronutrientes, Cobre (Cu); Ferro (K); Manganês (Mn) e Zinco (Zn), em folhas de *V. unguiculata* cv. BRS Imponente sob diferentes concentrações de NaCl, com e sem a inoculação com *R. clarus* expressas em g kg de massa seca<sup>-1</sup>. Letras minúsculas indicam diferença entre as concentrações de NaCl dentro da ausência (-FMA) e presença (+FMA) de inoculação, enquanto que (\*)

representa diferença entre a inoculação (-FMA e +FMA) dentro das  
mesmas concentrações de NaCl pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ). ...55

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>16</b>
<b>2.</b>	<b>CAPÍTULO I: METABOLISMO GERMINATIVO E CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE FEIJÃO-CAUPI (<i>VIGNA UNGUICULATA</i>) SOB ESTRESSE SALINO E OSMÓTICO .....</b>	<b>19</b>
	RESUMO.....	19
2.1.	INTRODUÇÃO.....	19
2.2.	MATERIAL E MÉTODOS .....	21
2.2.1.	Material vegetal e ensaio de germinação .....	21
2.2.2.	Efeitos da salinidade osmolalidade na germinação das sementes.....	22
2.2.3.	Embebição de sementes .....	22
2.2.4.	Avaliações bioquímicas .....	23
2.2.5.	Quantificação de sódio .....	24
2.2.6.	Desenvolvimento de plântulas .....	24
2.2.7.	Análises estatísticas .....	24
2.3.	RESULTADOS .....	25
2.3.1.	Germinação .....	25
2.3.2.	Marcadores do estresse oxidativo .....	26
2.3.3.	Enzimas da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e citrato sintase .....	29
2.3.4.	Concentração de Na <sup>+</sup> .....	31
2.3.5.	Desenvolvimento de plântulas .....	31
2.4.	DISCUSSÃO .....	32
2.5.	CONCLUSÃO .....	37
2.6.	REFERÊNCIAS .....	38
<b>3.</b>	<b>CAPÍTULO II: AUMENTO DA TOLERÂNCIA AO ESTRESSE SALINO EM PLANTAS DE FEIJÃO-CAUPI INOCULADAS COM O FUNGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR <i>RHIZOPHAGUS CLARUS</i>.....</b>	<b>42</b>
	RESUMO.....	42
3.1.	INTRODUÇÃO.....	42
3.2.	MATERIAL E MÉTODOS .....	44
3.2.1.	Condições experimentais .....	44
3.2.2.	Colonização micorrízica.....	45
3.2.3.	Concentração de prolina.....	45



3.2.4.	Avaliações anatômicas .....	45
3.2.5.	Avaliações nutricionais .....	46
3.2.6.	Produtividade de grãos e biomassa.....	47
3.2.7.	Análises estatísticas .....	47
3.3.	RESULTADOS .....	47
3.3.1.	Produção de biomassa e produtividade de grãos.....	47
3.3.2.	Colonização micorrízica.....	49
3.3.3.	Concentração de prolina.....	51
3.3.4.	Marcadores anatômicos .....	52
3.3.5.	Concentração de nutrientes nas folhas .....	54
3.3.6.	Íons potencialmente tóxicos .....	56
3.4.	DISCUSSÃO .....	58
3.5.	CONCLUSÃO .....	61
3.6.	REFERÊNCIAS .....	62
<b>4.</b>	<b>CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>66</b>
<b>5.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>66</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>67</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Em todo mundo cerca de um bilhão de hectares de solos são afetados pelo acúmulo excessivo de sais, ocasionado pelo intenso impacto antrópico nos agroecossistemas, assim como pelo agravamento das temperaturas terrestres (FAO; ITPS, 2015). Mundialmente a condutividade elétrica (CE) é a forma mais prática para medir a salinidade do solo (BARROCA, 2019), onde a CE de  $4 \text{ dS m}^{-1}$  (respectivo a 40 mM de NaCl) tem sido utilizada para designar o limite entre os solos não salinos e salinos (MUNNS, 2005), embora algumas espécies vegetais possam sofrer o efeito deletério da salinidade em CE superiores a  $2,5 \text{ dS m}^{-1}$ . Tal condição reduz a capacidade das plantas em absorver água, impactando as fases iniciais de desenvolvimento vegetal e acarretando num conjunto de alterações metabólicas semelhantes às provocadas pelo estresse hídrico (MUNNS, 2002; OLIVEIRA et al., 2018), bem como pode causar estresse iônico e desencadear queimas oxidativas (SILVEIRA et al., 2010). Desta forma, o crescimento das plantas, assim como seu rendimento podem ser extremamente afetados pela salinidade, que em alguns casos pode acarretar em perda total da cultura (DIAS et al., 2016).

Dentre os componentes dos solos salinos, destaca-se o sódio (Na), este elemento pode alterar a atividade enzimática e a estrutura funcional das proteínas, além de causar desbalanço nutricional nas plantas (SILVEIRA et al., 2010), levando à destruição da microestrutura, disfunções de diferentes órgãos e assim a apoptose e morte do vegetal (SILVEIRA et al., 2010; YANG et al., 2011). Entretanto, várias espécies vegetais desenvolveram mecanismos biomoleculares, de ajustamento osmótico, de transporte celular e de proteção contra o estresse oxidativo para defesa e atenuação do estresse salino (MUNNS; TESTER, 2008; SILVEIRA et al., 2010).

Entre as espécies relatadas como tolerantes ou moderadamente tolerante ao estresse salino destaca-se o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) (GHEYI et al., 2016). Essa leguminosa apresenta em seus grãos entre 20 - 39 % de composição proteica (GONÇALVES et al., 2016), e tem sido amplamente produzida em diferentes regiões em todo o mundo (GONÇALVES et al., 2016). Sua importância socioeconômica se deve principalmente ao seu plantio em localidades sujeitas a déficit hídrico e salinidade, representando renda e fonte alimentar para a

população, geralmente de baixa renda, que habita essas regiões (ENYIUKWU et al., 2018; GHEYI et al., 2016).

Entretanto, uma ampla variação da tolerância a salinidade pode ser encontrada em cultivares de uma mesma espécie, bem como ao longo do desenvolvimento de uma cultivar. Identificar o limiar de tolerância de uma cultivar, bem como os mecanismos de tolerância e práticas que possam atenuar o estresse salino, são informações extremamente relevantes para tomada de decisão por parte dos produtores, assim como para o desenvolvimento e aprimoramento de cultivares que garantam a produção de grãos frente aos contínuos incrementos da salinidade do solo (JAMIL et al., 2011).

As fases iniciais de desenvolvimento podem estar ligeiramente atreladas a resposta final de crescimento das plantas, uma vez que os danos iniciais serão refletidos ao longo do crescimento e desenvolvimento vegetal (MUNNS; TESTER, 2008). Entretanto algumas práticas podem ser empregadas para amenizar os efeitos deletérios da salinidade, como a utilização da inoculação de microrganismos rizosféricos. Comunidades microbianas no solo por exemplo, podem diminuir o efeito deletério de estresses bióticos e abióticos sobre as plantas (BUSBY et al., 2017; PRASAD et al., 2010). Entre estes microrganismos destacam-se os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), os quais estão presentes em todos os tipos de solos, formando associações com mais de 80% das espécies vegetais (ORDOÑES et al., 2016).

Os benefícios da associação com FMA frente ao estresse salino se deve ao aumento do volume de solo explorado pelo micélio fúngico, que aumenta a aquisição de água e nutrientes pelas plantas, além do papel dos fungos em atenuar os efeitos deletérios dos sais na fotossíntese (PORCEL et al., 2016; WU et al., 2015), e o estresse oxidativo associado à aquisição de elevadas quantidades de sais (BORDE et al., 2011; ESTRADA et al., 2013; WU et al., 2010). Desta forma a inoculação de FMA pode constituir uma estratégia para assegurar às plantas uma maior tolerância a salinização do solo, agregando maiores chances para seu estabelecimento e desenvolvimento em campo.

Neste contexto, o presente estudo objetivou avaliar a influência da salinidade do solo em diferentes fases de desenvolvimento de *Vigna unguiculata* cv. BRS Imponente e investigar se a inoculação das plantas com o fungo micorrízico

arbuscular *Rhizophagus clarus* constitui uma prática a ser indicada para a produção da cultivar em áreas afetadas por sais.

## 2. CAPÍTULO I: METABOLISMO GERMINATIVO E CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE FEIJÃO-CAUPI (*Vigna unguiculata*) SOB ESTRESSE IÔNICO E OSMÓTICO

### RESUMO

A salinidade do solo é uma condição que representa um potencial estresse ao desenvolvimento vegetal e sua abrangência tem aumentado com o incremento na temperatura e das práticas agrícolas. O Feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma espécie relatada com tolerância moderada a condições de salinidade do solo, porém esta condição é variável entre diferentes cultivares e fases fenológicas. Neste trabalho foi investigado a resposta da germinação de sementes e estabelecimento de plântulas de *V. unguiculata* cv. BRS Imponente sob condições de estresse salino (NaCl) e hídrico (Polietilenoglicol 6000; PEG). Embora tais condições acarretem em acúmulo de espécies reativas de oxigênio ( $H_2O_2$ ), apenas nas sementes expostas ao PEG foi observado dano oxidativo (acúmulo de MDA). A manutenção das concentrações de  $H_2O_2$  em sementes expostas ao NaCl, bem como o aumento da atividade respiratória foram os principais mecanismos de tolerância identificados nas sementes expostas a NaCl. Entretanto, embora a germinação não tenha sido afetada, concentrações de NaCl  $\geq 75$  mM foram fitotóxicas, reduzindo o crescimento das plântulas. O componente osmótico da salinidade (PEG) reduziu a germinação ( $\Psi_o < -0,123$  MPa) e o estabelecimento de plântulas (todos os potenciais osmóticos). Tendo em vista que a salinização dos solos tende a aumentar com os incrementos previstos na temperatura ao longo do próximo século, estudos sobre a tolerância das plantas bem como o desenvolvimento de técnicas que visem atenuar o estresse salino e osmótico na cultura são de extrema urgência para a manutenção da segurança alimentar de regiões onde o feijão-caupi desempenha papel socioeconômico importante.

Palavras-chave: Salinidade do solo. Respiração Celular. Estresse oxidativo

### 2.1. INTRODUÇÃO

A diminuição do rendimento das culturas agrícolas devido à salinização do solo tem chamado atenção da comunidade científica (FAROOQ et al., 2017), pois desencadeia impactos ecológicos e socioeconômicos devido à menor produção de alimentos (SILVEIRA et al., 2010). O excesso de sais no solo é uma condição que atinge todos os continentes do mundo, afetando aproximadamente um bilhão de hectares (FAO; ITPS, 2015). Tal problema pode ser de origem natural, relacionada a pedologia e condições climáticas da região (salinização primária), bem como desenvolvida a partir do manejo inadequado dos recursos de produção (salinização

secundária) (FERNANDES et al., 2019). Atrelado a isso, o aumento das temperaturas globais pode acentuar o processo de salinização (ABDULLAH et al., 2019), pois influenciam diretamente na dinâmica da água, podendo ocasionar déficit hídrico e aumento da concentração de sais nos solos (BARROCA, 2019).

A salinização impõe três condições de estresse aos vegetais: o estresse hídrico ou osmótico gerado pelo déficit de água (SILVEIRA et al., 2010), o estresse iônico gerado pela alteração na razão de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (BLUMWALD, 2000) e/ou o estresse oxidativo gerado pela superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROS) (MAIA et al., 2012). Combinadas, essas condições podem induzir alteração na atividade de enzimas e na estrutura funcional de proteínas, redução da expansão foliar e do crescimento vegetal, bem como queimas oxidativas, desbalanço do potencial de membranas e nutricional (SILVEIRA et al., 2010), afetando o crescimento e desenvolvimento das plantas. Redução de mais de 50% na produtividade de várias culturas foram observadas quando irrigadas com água com condutividade elétrica superior a  $4 \text{ dS m}^{-1}$  (FAROOQ et al., 2017). Neste contexto, na tentativa de desenvolver técnicas de melhorias da produção em solos salinizados, têm-se buscado identificar espécies ou cultivares agrícolas tolerantes, bem como compreender os mecanismos de tolerância destas espécies ao estresse salino.

O Feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) desempenha papel estratégico em regiões áridas e semiáridas do mundo (BOUKAR et al., 2015), devido a sua alta adaptabilidade às condições edafoclimáticas dessas regiões (COELHO et al., 2014; GHEYI et al., 2016). Esta espécie representa uma importante fonte de proteína, fibras e minerais (MORAIS et al., 2018; PEREIRA et al., 2016), utilizada na alimentação humana e suplementação animal (BATISTA et al., 2012). Embora seja descrita entre as espécies com tolerância moderada a salinidade dos solos (PEREIRA et al., 2019), pouco se sabe sobre os limites de tolerância desta cultivar, bem como sobre as respostas de suas diferentes fases fenológicas à elevadas concentrações de sal.

A germinação e o crescimento inicial das plantas são eventos limitantes ao sucesso das culturas. Durante a germinação, o metabolismo respiratório é o principal responsável pela produção de energia química a ser utilizada no processo de crescimento do eixo embrionário (GOMES; GARCIA, 2013). Em decorrência da reativação do metabolismo respiratório em sementes embebidas, há também

concomitante produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), os quais agem em conjunto com hormônios vegetais como sinalizadores no processo de germinativo (GOMES; GARCIA, 2013). Entretanto, o balanço fino entre a produção e a limpeza das EROS se faz necessário, uma vez que quando acumuladas, as EROS podem causar danos oxidativos, interferindo negativamente na germinação e posterior estabelecimento de plântulas (GOMES; GARCIA, 2013). Desta forma, foi hipótese deste trabalho que o metabolismo respiratório e oxidativo estão intrinsecamente relacionados à capacidade germinativa de plantas submetidas ao estresse salino.

Neste contexto, no presente estudo, a germinação e o desenvolvimento de plântulas de feijão-caupi em condições de estresse salino foram investigados. Particularmente, estudou-se o metabolismo oxidativo e respiratório em sementes expostas a concentrações crescentes de sal (NaCl), com o intuito de relacionar a importância destes processos fisiológicos com o sucesso germinativo das sementes de feijão-caupi em condições de estresse salino. Finalmente, através do tratamento com Polietilenoglicol 6000 (PEG), diferenciou-se o caráter iônico e osmótico envolvidos nas respostas das plantas à salinização.

## 2.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1. Material vegetal e ensaio de germinação

As sementes de *Vigna unguiculata* cv. BRS Imponente, safra 2018, foram adquiridas da empresa Cebal Agro (Paraná, Brasil). A viabilidade inicial das sementes foi avaliada pelo teste de tetrazólio antes da germinação. Para tal, as sementes foram pré-embebidas em água destilada por seis horas e então imersas em solução de tetrazólio 0.5% (cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazolio, Sigma) por duas horas no escuro. A viabilidade do lote de sementes foi de 100%.

Para os testes de germinação, as sementes foram superficialmente desinfestadas em hipoclorito de sódio a 1,5 % por dois minutos e lavadas com água deionizada antes da semeadura. Os testes de germinação foram realizados colocando-se quatro repetições de 10 sementes em caixas de germinação do tipo Gerbox contendo 50 g de substrato composto pela mistura de vermiculita e areia (2:1 v/v). As caixas de germinação foram regadas com as devidas soluções de tratamento com volume referente a 70 % da capacidade de campo do substrato (10



mL). Em seguida, as caixas foram acondicionadas aleatoriamente em uma câmara de crescimento tipo B.O.D a  $25 \pm 2$  °C sob um fotoperíodo de 12 horas ( $30 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , Philips T2 40 W / 3 lâmpadas). As sementes foram consideradas germinadas após a emergência de aproximadamente 2 mm da raiz primária. Para garantir a reprodutibilidade dos dados, o experimento de germinação foi repetido três vezes, sem diferença estatística significativa de acordo com a ANOVA (dados não mostrados).

#### 2.2.2. Efeitos da salinidade e osmolaridade na germinação das sementes

Cloreto de sódio grau HPLC e Polietilenoglicol (PEG) 6000 obtidos da Sigma-Aldrich (Brasil) foram utilizados nos experimentos. Solução estoque de NaCl ( $58,44 \text{ g l}^{-1}$ ) e diferentes soluções de PEG foram preparadas em água ultrapura e usadas para a obtenção das soluções com as concentrações desejadas para irrigar as sementes. As sementes foram expostas a diferentes concentrações de NaCl (0, 25, 50, 75 e 100 mM), com base em sua ocorrência natural em solos brasileiros (FREIRE et al., 2014; PEREIRA et al., 2019). Utilizando a fórmula de Van't Hoff (YAMASHITA et al., 2009), o potencial osmótico das soluções de NaCl foi calculado, sendo: 0; -0,123; -0,247; -0,371 e -0,495 MPa, respectivamente. Os mesmos potenciais osmóticos foram replicados utilizando PEG, para investigar o efeito osmótico separado do iônico na germinação das sementes. As concentrações de PEG correspondentes aos potenciais de 0; -0,123; -0,247; -0,371 e -0,495 MPa, foram 0; 87,89; 134,42; 170,53 e 200,94  $\text{g l}^{-1}$ , respectivamente (VILLELA et al., 1991).

Baseado na curva de germinação cumulativa, avaliada em intervalos de 12 horas, o tempo médio (TM) foi calculado de acordo com Bianchetti; Amaral (1978). Portanto, investigou-se as alterações fisiológicas da germinação precoce das sementes, até 12 horas após a indução do tratamento.

#### 2.2.3. Embebição de sementes

A embebição foi avaliada por pesagem das sementes em intervalos de 1 h ao longo de 12 h de exposição em experimento paralelo sob as mesmas condições utilizadas nos testes de germinação.

#### 2.2.4. Avaliações bioquímicas

As avaliações bioquímicas foram realizadas em embriões de *V. unguiculata*. As avaliações foram realizadas em sementes tratadas em experimentos paralelos nas mesmas condições utilizadas nos testes de germinação, às 3, 6, 9 e 12 h após a indução dos tratamentos. Em cada tempo de avaliação, de cada caixa de germinação foram coletadas quatro sementes, que foram maceradas em almofariz com adição de nitrogênio líquido, constituindo uma repetição (num total de quatro repetições/tratamento). As amostras foram armazenadas em freezer a -20 °C até análises. A concentração de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foi avaliada seguindo Velikova et al. (2000), utilizando 0,1 g de sementes. As atividades das enzimas catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) foram avaliadas segundo Aebi (1984) e Nakano; Asada (1981), respectivamente, em extratos de 0,1 g de sementes homogeneizadas em 1 mL de tampão de extração contendo 100 mmol L<sup>-1</sup> de tampão fosfato de potássio (pH 7,8), 100 mmol L<sup>-1</sup> de EDTA, 1 mmol L<sup>-1</sup> de ácido L-ascórbico e 2 % de PVP (m/v) (GOMES et al., 2016). O conteúdo proteico das amostras foi determinado usando o método de Bradford (BRADFORD, 1976). Os danos oxidativos foram determinadas pela peroxidação de lipídeos baseada na produção de malondialdeído (MDA), segundo o método de Hodges et al. (1996), usando 0,1 g de semente.

A atividade das enzimas da cadeia de transporte de elétrons mitocondriais (CTE) foi avaliada espectrofotometricamente em homogenatos de sementes (tampão fosfato 200 mM. pH 7,5), utilizando 50 µg de proteína. Os ensaios do complexo I (NADH: ubiquinona oxidoreductase) e complexo II (succinato desidrogenase) foram realizados de acordo com Estornell et al. (1993), e as suas atividades foram calculadas monitorando as taxas de NADH ( $\epsilon = 5,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) e a diminuição de ubiquinona ( $\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) por mg de proteína. A atividade do complexo III (ubiquinol-citocromo c redutase) foi determinada seguindo Birch-Machin; Howell; et al. (1993), monitorando as taxas de redução do citocromo cIII ( $\epsilon = 19 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). A atividade do complexo IV (citocromo c oxidase) foi determinada segundo Birch-Machin; Jackson; et al. (1993), calculando a taxa de aumento na absorbância causada pela oxidação do citocromo cII para o citocromo cIII ( $\epsilon = 19 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). A atividade do Complexo V (ATP-sintase) foi determinada pelo

monitoramento dos aumentos de pH associados à síntese de ATP, de acordo com Madeira et al. (1974). A atividade da citrato sintase foi medida seguindo a redução do nucleotídeo de acetilpiridina adenina a 365 nm, usando o coeficiente de extinção de  $9,100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  de acordo com Jenner et al. (2001). Todas as atividades foram expressas por micrograma de proteína (determinada pelo método de Bradford).

#### 2.2.5. Quantificação de sódio

Avaliações da concentração de sódio ( $\text{Na}^+$ ) (MARTINS; REISSMANN, 2007), foram feitas em sementes do tratamento controle e expostas aos tratamentos com NaCl. Para tal, semente foram secas a  $65^\circ\text{C}$  até obter peso constante, e moídas em moinho portátil. Então 0,30 g de material seco foi digerido em mufla à  $500^\circ\text{C}$  por três horas. Em seguida foi adicionado 1 mL de HCl 3 M, e novamente as amostras foram aquecidas a  $500^\circ\text{C}$  por três horas. Após resfriamento à temperatura ambiente, a extração de  $\text{Na}^+$  foi feita com a adição de 5 mL de HCl 3 M em chapa aquecedora a  $200^\circ\text{C}$  por 10 minutos. As amostras foram então filtradas em papel filtro laboratorial classificação azul, e tiveram seu volume completado para 50 mL com água destilada. A determinação da concentração dos íons sódio foi feita por espectroscopia atômica em fotômetro de chama modelo Dm-62 (Digimed, Brazil).

#### 2.2.6. Desenvolvimento de plântulas

Após o sétimo dia de exposição das sementes aos diferentes tratamentos com NaCl ou PEG, as plântulas foram coletadas e mensurou-se o comprimento radicular e altura da parte aérea.

#### 2.2.7. Análises estatísticas

Uma MANOVA de medidas repetidas, com o tempo como fator intra-sujeito e a adição de NaCl ou PEG como principais efeitos, foi utilizada para analisar diferenças nas variáveis estudadas (germinação, marcadores do estresse oxidativo, enzimas relacionadas às mitocôndrias e concentração de  $\text{Na}^+$ ) ao longo do tempo de exposição aos tratamentos. A esfericidade dos dados foi testada pelos critérios de Mauchly para determinar se os testes F univariados para os efeitos dentro do sujeito

eram válidos. Nos casos de F inválido, o teste de Greenhouse-Geisser foi utilizado para estimar o epsilon ( $\epsilon$ ). A análise de contraste foi utilizada quando houve diferenças significativas nas variáveis estudadas entre os tratamentos (Tabela 1). O tempo médio de germinação foi testado por ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste post hoc de Tukey ( $P < 0,05$ ). Os modelos lineares generalizados (GLMs) foram criados para avaliar diferenças nos valores da altura da parte aérea e do comprimento radicular das plântulas entre os compostos (NaCl e PEG), em diferentes tempos de observação. As médias foram comparadas aos pares usando um coeficiente de 5 % de probabilidade. Os resultados foram expressos como as médias de todas as plantas emergidas de quatro repetições. Todas as análises estatísticas foram executadas no programa estatístico JMP 13.2 (SAS Inst. Inc).

Tabela 1. MANOVA medidas repetidas para os efeitos de diferentes potenciais osmóticos (MPa) gerados por NaCl ou PEG e diferentes tempos de exposição (horas) em sementes de *Vigna unguiculata* L. Walp.

FV	GL	Germinação	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	CAT	APX	MDA	CI	CII	CIII	CIV	CV	Citrato	Na <sup>+</sup>
Trat	8	63.0 ***	19.3 ***	21.2 ***	2.9 *	21.2 ***	226.5 ***	271.0 ***	275.2 ***	165.9 ***	129.7 ***	57.0 ***	121.8 ***
Tempo	3	567.0 ***	125.2 ***	192.0 ***	2.3 na	142.1 ***	200.3 ***	537.8 ***	474.1 ***	346.2 ***	271.3 ***	140.2 ***	1.4 na
Trat x Tempo	35	6.6 ***	9.0 ***	5.3 ***	11.8 ***	15.8 ***	5.2 ***	9.8 ***	7.9 ***	5.7 ***	6.5 ***	4.6 ***	5.3 *

Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), peroxidação de lipídeos (MDA), atividades enzimáticas da cadeia de transporte de elétrons mitocondriais (Complexo [C] I a V), citrato sintase (Citrato) e concentração de sódio (Na<sup>+</sup>).

GL Graus de Liberdade; \*\*\* Significativo a 1% de probabilidade; \* Significativo a 5% de probabilidade.

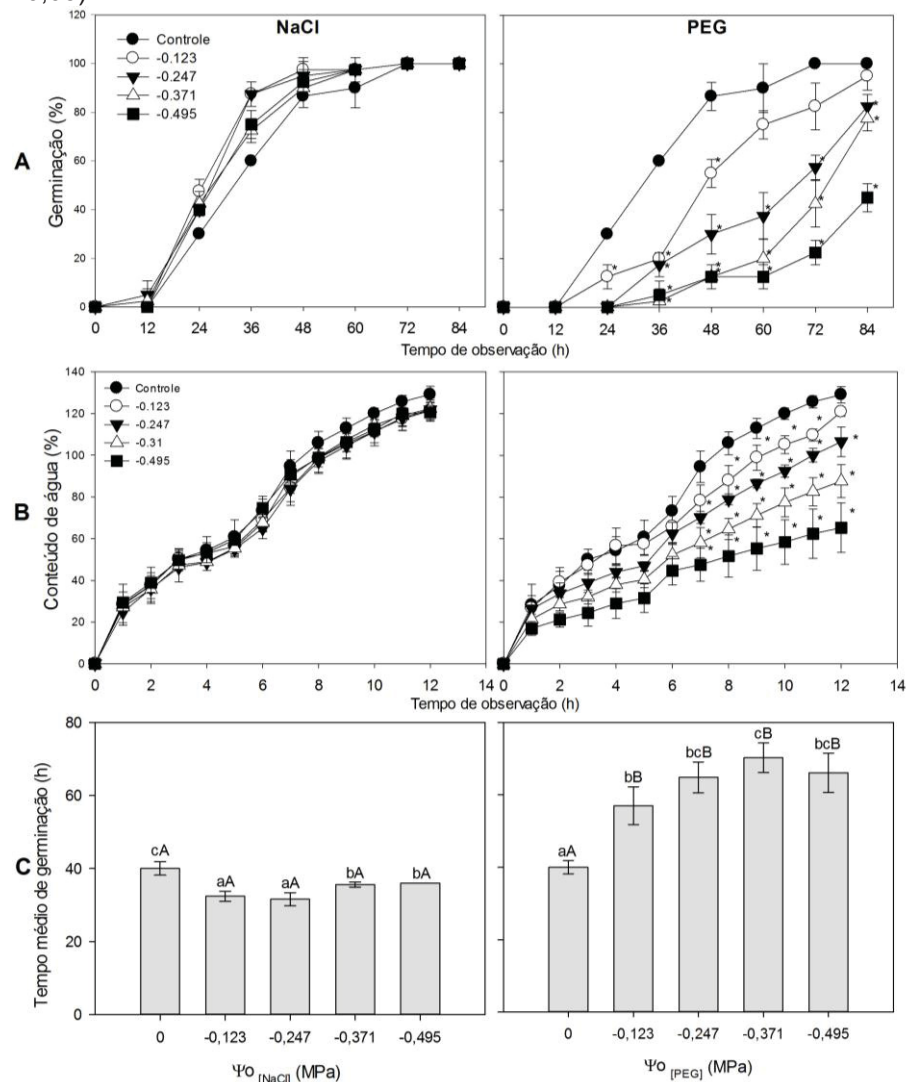
## 2.3. RESULTADOS

### 2.3.1. Germinação

Embora o percentual total de germinação (Fig. 1A) e o conteúdo de água das sementes ao longo do tempo (Fig. 1B) não tenham sido significativamente afetados ( $P < 0,05$ ), sementes tratadas com NaCl apresentaram menor tempo médio de germinação (TMG) em relação ao controle (Fig. 1C;  $P < 0,05$ ). Ao contrário, sementes submetidas a potenciais osmóticos inferiores a -0,247 MPa gerados pelo PEG apresentaram menor percentual total de germinação (Fig. 1A) e maior TMG (Fig. 1C) ( $P < 0,05$ ). Além disso, a partir das 7 h de embebição, sementes expostas ao PEG apresentaram menor conteúdo de água que as sementes do tratamento controle e as de potencial osmótico equivalente gerado pelo NaCl (com exceção de sementes do potencial -0,123 MPa às 12 h) ( $P < 0,05$ ; Fig. 1B). Sementes expostas a

potencial osmótico  $\leq -0,247$  MPa gerados pelo PEG também apresentaram menor germinabilidade comparadas às de mesmo potencial gerado pelo NaCl (Fig. 1A).

Figura 1. A) Porcentagem de germinação, B) embebição (conteúdo de água) e C) tempo médio de germinação de sementes de *V. unguiculata* submetidas a diferentes potenciais osmóticos (MPa) gerados por NaCl ou PEG. Barras representam média  $\pm$  SD de quatro repetições. Em A e B, \*representa diferença significativa entre NaCl e PEG dentro do mesmo potencial osmótico e tempo de avaliação pelo teste de Contraste ( $P < 0,05$ ). Em C, letras minúsculas representam diferença entre os potenciais osmóticos dentro dos tratamentos com NaCl ou PEG, enquanto letras maiúsculas representam diferença entre os compostos dentro do mesmo potencial osmótico pelo teste de Contraste ( $P < 0,05$ ).



FONTE: O autor (2020).

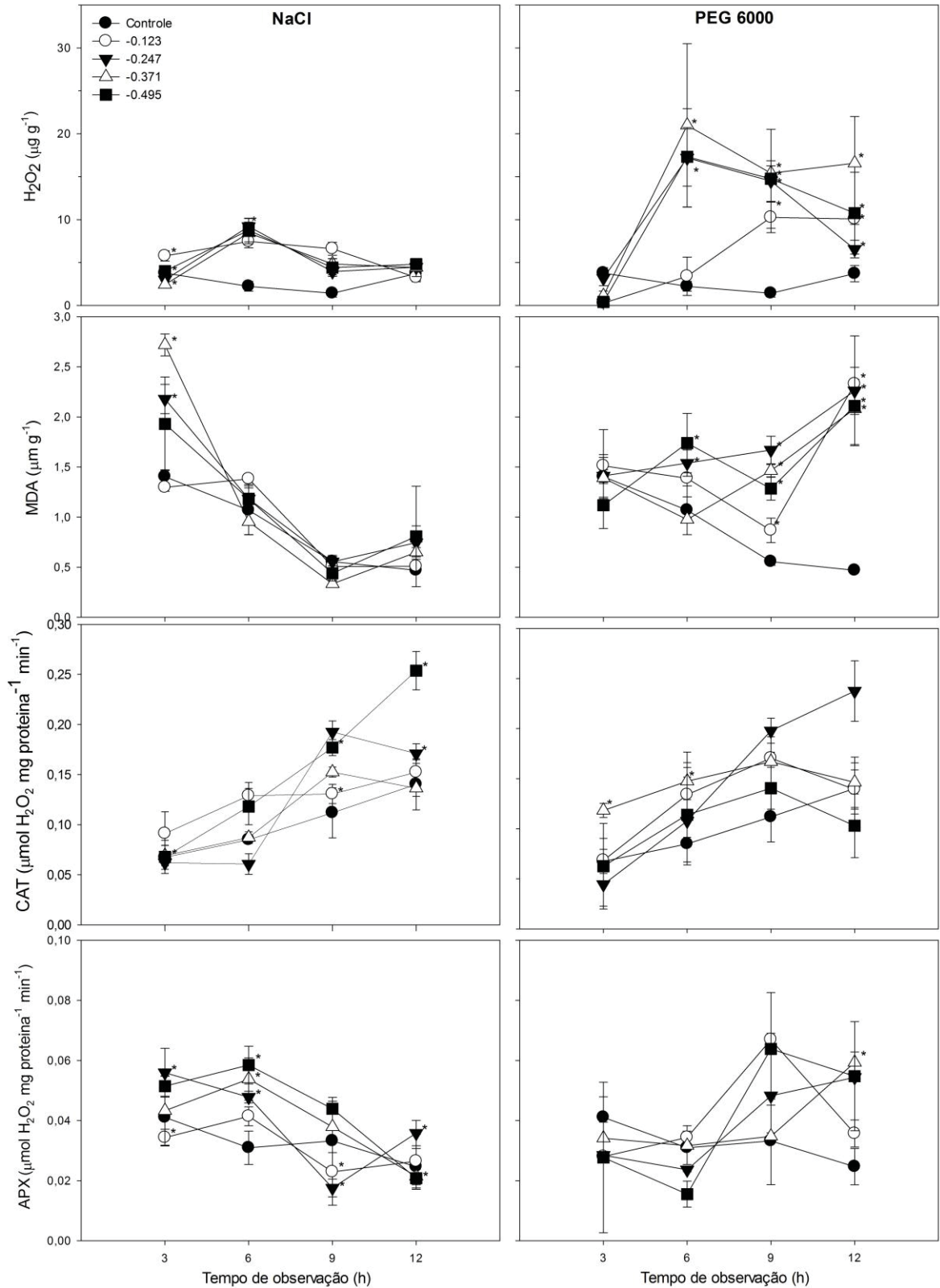
### 2.3.2. Marcadores do estresse oxidativo

De 6 a 9 h após a semeadura, maiores concentrações de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) foram observadas nas sementes tratadas com NaCl em relação ao controle (Fig. 2). A concentração de  $H_2O_2$  também foi maior entre 9 e 12 h em

sementes do potencial osmótico -0,123 MPa e de 6 a 12 h após a semeadura em sementes expostas a potenciais osmóticos  $\leq$  -0,247 MPa gerados pelo PEG em relação ao controle (Fig. 2;  $P < 0,05$ ). Com exceção da primeira avaliação (3 h), sementes expostas a potenciais osmóticos  $\leq$  -0,247 MPa gerados pelo PEG apresentaram maior concentração de  $H_2O_2$  em relação às de potencial osmótico equivalente gerado pelo NaCl. Isso também foi observado em sementes expostas ao potencial osmótico -0,123 MPa, porém somente após 9 e 12 h de semeadura (Fig. 2). A concentração de MDA (peroxidação de lipídios) não diferenciou significativamente ( $P < 0,05$ ) entre sementes do tratamento controle e as tratadas com NaCl, exceto para as do potencial -0,371 MPa após 3 h de semeadura (Fig. 2). Nas sementes tratadas com PEG, maior concentração de MDA foi observada em relação ao controle e às sementes de mesmo potencial gerado pelo NaCl às 9 e 12 h após a semeadura ( $P < 0,05$ ; Fig. 2).

Das 6 às 12 h após a semeadura, a atividade da catalase (CAT) foi significativamente maior ( $P < 0,05$ ) em sementes do potencial osmótico -0,495 MPa expostas ao NaCl, em relação ao controle (Fig. 2). Similarmente, às 9 e 12 h após a semeadura, sementes do potencial osmótico -0,247 MPa gerados pelo PEG apresentaram maior atividade da CAT em relação ao controle (Fig. 2). Às 6 h após a semeadura, a atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi maior em sementes expostas ao NaCl em relação ao controle ( $P < 0,05$ ; Fig. 2).

Figura 2. Análises bioquímicas: Concentrações de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), peroxidação de lipídeos (MDA), atividade de catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) em sementes de *V. unguiculata* expostas a diferentes potenciais osmóticos (MPa) gerados por NaCl ou PEG ao longo do tempo. \*representa diferença significativa entre NaCl e PEG dentro do mesmo potencial osmótico e tempo de avaliação pelo teste de Contraste ( $P < 0,05$ ).



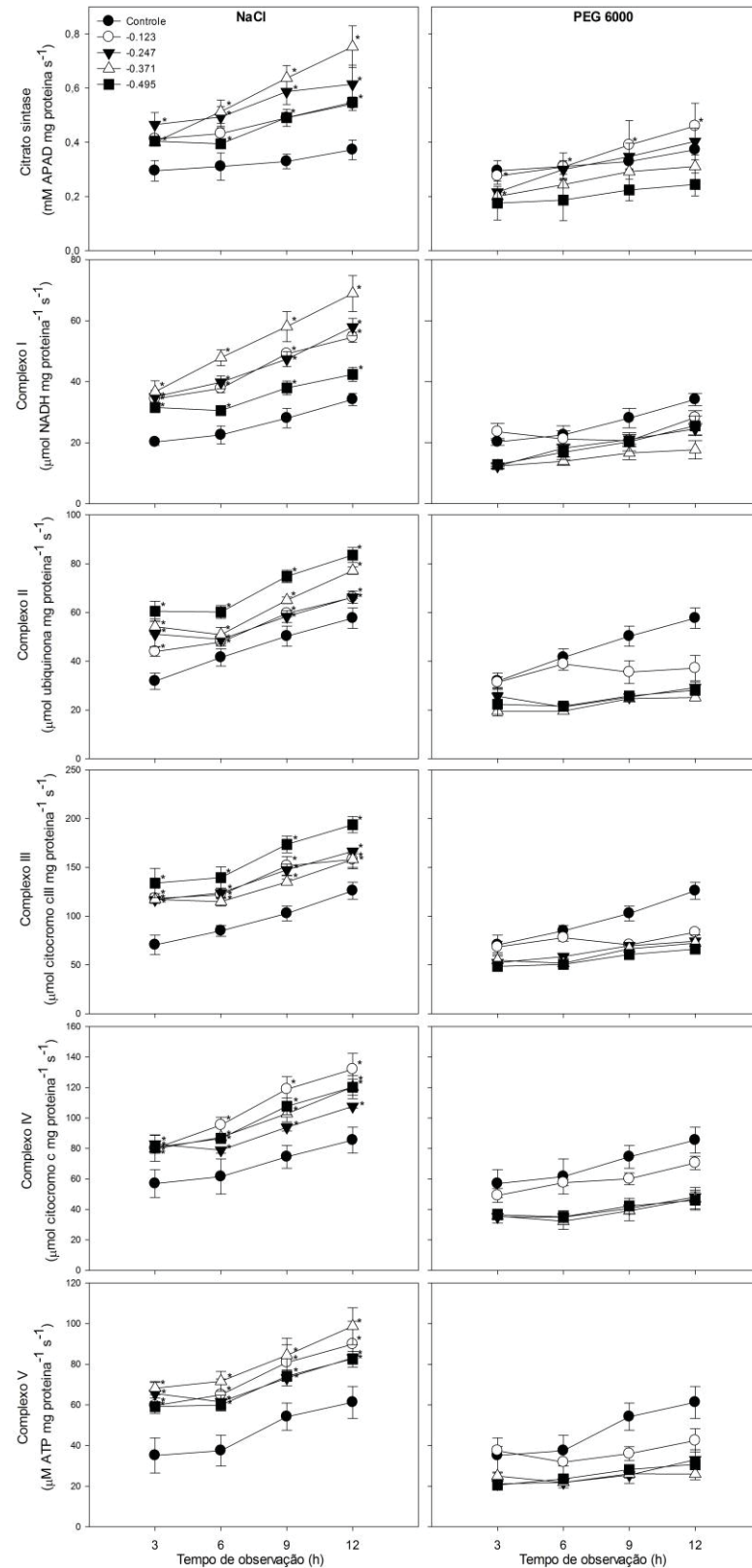
FONTE: O autor (2020).



### 2.3.3. Enzimas da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e citrato sintase

Independente do tempo de avaliação, a atividade das enzimas da cadeia de transporte de elétrons (CTE) mitocondrial (Complexo I ao V) e da citrato sintase foram maiores em sementes expostas ao NaCl em relação ao controle ( $P < 0,05$ ; Fig. 3). Até as 6 h após a semeadura, sementes expostas ao potencial osmótico  $-0,123$  MPa gerado pelo PEG apresentaram atividade das enzimas mitocondriais similar às do tratamento controle ( $P < 0,05$ ; Fig. 3). Entretanto de 9 a 12 h após a semeadura, a atividade das enzimas da CTE mitocondrial foi significativamente ( $P < 0,05$ ) reduzida nessas sementes (Fig. 2). Similarmente, em relação ao controle, as enzimas da CTE mitocondrial apresentaram menor atividade em sementes expostas a potencial osmótico  $\leq -0,247$  MPa gerado pelo PEG em todos os tempos de avaliação ( $P < 0,05$ ; Fig. 3). Em todos os tempos avaliados, sementes do potencial osmótico  $-0,495$  MPa gerado pelo PEG apresentaram menor atividade da citrato sintase em relação ao controle. Independentemente do tempo de avaliação, a atividade de todas as enzimas mitocondriais foi maior em sementes tratadas com NaCl em relação ao PEG com mesmo potencial osmótico (Fig. 3).

Figura 3. Avaliações bioquímicas: Atividade da enzima Citrato sintase, e das enzimas associadas à cadeia de transporte de elétrons mitocondrial ao longo do tempo. Complexo I (NADH: ubiquinona oxidoreductase), Complexo II (succinato desidrogenase), Complexo III (Ubiquinol-citocromo c redutase), Complexo IV (citocromo c oxidase) e Complexo V (ATP sintase) em sementes de *V. unguiculata* expostas a diferentes potenciais osmóticos gerados por NaCl ou PEG. \*representa diferença significativa entre NaCl e PEG dentro do mesmo potencial osmótico e tempo de avaliação pelo teste de Contraste ( $P < 0,05$ ).

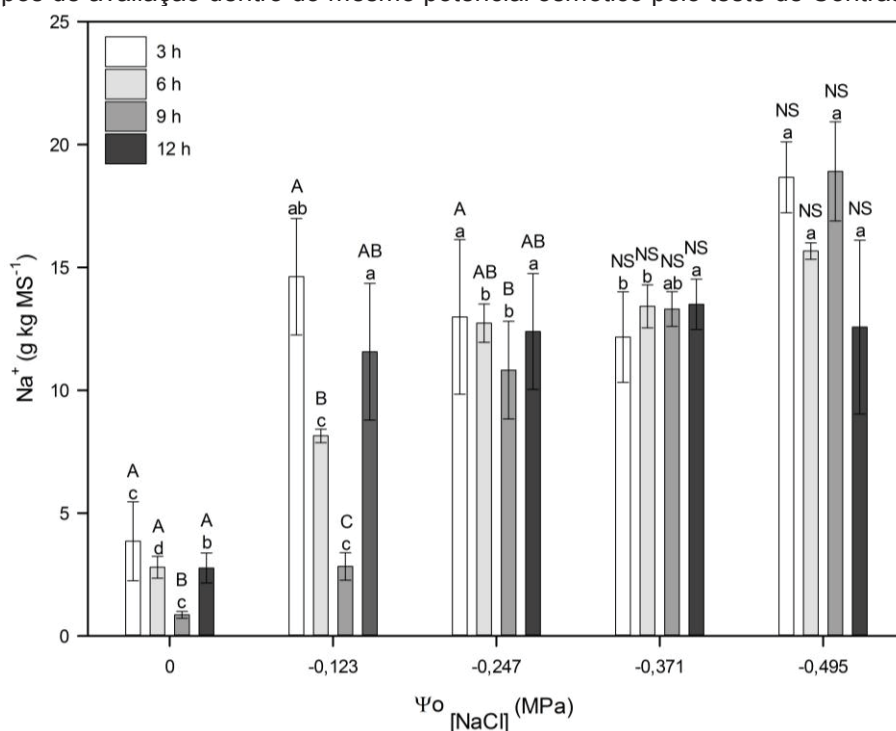


FONTE: O autor (2020).

### 2.3.4. Concentração de Na<sup>+</sup>

Independente do tempo de avaliação, a concentração de Na<sup>+</sup> foi maior em sementes tratadas com NaCl em relação ao controle (Fig. 4).

Figura 4. Concentrações de sódio (Na<sup>+</sup>) em sementes de *V. unguiculata* expostas a concentrações crescentes de NaCl. Letras minúsculas representam diferença entre os potenciais osmóticos dentro do mesmo tempo de avaliação (3, 6, 9 e 12 h), enquanto letras maiúsculas representam diferença entre os tempos de avaliação dentro do mesmo potencial osmótico pelo teste de Contraste (P<0,05).



FONTE: O autor (2020).

### 2.3.5. Desenvolvimento de plântulas

Plântulas submetidas a potenciais osmóticos  $\leq -0,371$  gerados pelo NaCl apresentaram diminuição na altura da parte aérea e no comprimento das raízes (P<0,05). Similarmente, o PEG afetou negativamente a altura da parte aérea e comprimento das raízes (P<0,05), independente do potencial osmótico (Tabela 2). Plantas expostas ao PEG apresentaram menor altura e comprimento da raiz (com exceção do menor potencial osmótico) que aquelas de potencial osmótico equivalente gerado pelo NaCl (P<0,05).

Tabela 2. Altura da parte aérea e comprimento radicular de plântulas de *V. unguiculata* expostas a diferentes potenciais osmóticos gerados por NaCl ou PEG. Letras minúsculas comparam medias na linha e maiúsculas na coluna dentro de cada variável pelo teste de GLM ( $P < 0,05$ ;  $n=3$ ).

$\Psi_o$ (MPa)	Parte aérea (cm)		Raiz (cm)	
	NaCl	PEG	NaCl	PEG
0.000	12.83 <sup>Aa</sup>	12.83 <sup>Aa</sup>	18.06 <sup>Aa</sup>	18.06 <sup>Aa</sup>
-0.123	12.13 <sup>Aa</sup>	7.79 <sup>Bb</sup>	16.53 <sup>Aa</sup>	14.08 <sup>Ba</sup>
-0.247	12.06 <sup>Aa</sup>	5.55 <sup>Cb</sup>	17.67 <sup>Aa</sup>	12.43 <sup>BCb</sup>
-0.371	6.80 <sup>Ba</sup>	3.47 <sup>Db</sup>	13.63 <sup>Ba</sup>	11.09 <sup>Cb</sup>
-0.495	8.05 <sup>Ba</sup>	3.33 <sup>Db</sup>	13.42 <sup>Ba</sup>	11.68 <sup>BCa</sup>

FONTE: O autor (2020).

## 2.4. DISCUSSÃO

A salinização do ambiente de germinação não só pode restringir o processo de embebição das sementes como induzir toxicidade pela absorção e acúmulo de íons deletérios, como sódio ( $\text{Na}^+$ ) e cloro ( $\text{Cl}^-$ ) nas sementes (JOSÉ et al., 2016). Neste trabalho, porém, foi observado que o estresse salino por cloreto de sódio (NaCl) ( $\leq 100$  mM) não afetou a germinação das sementes de feijão-caupi. Entretanto, as sementes se mostraram sensíveis aos potenciais osmóticos das soluções salinas, como demonstrado pelo tratamento das sementes com Polietilenoglicol 6000 (PEG). Portanto, objetivou-se compreender as respostas fisiológicas diferenciais de sementes expostas a condições de potencial iso-osmóticos gerados por NaCl e PEG.

O estresse hídrico gerado pelo seu efeito negativo no processo de embebição, tem sido relatado como o principal problema gerado pela salinização na germinação de sementes (BLUMWALD, 2000; SILVEIRA et al., 2010; JOSÉ et al., 2016). De fato, o tratamento das sementes com PEG evidencia o efeito deletério dos potenciais osmóticos negativos estudados na embebição das sementes (Fig. 1B). Em consequência do atraso na absorção de água, maior tempo médio de germinação (TMG) e menor germinabilidade (em potenciais  $\leq -0,247$ ) foi observado em sementes submetidas ao PEG (Fig. 1). Ao contrário dos sais, o PEG não é absorvido pelas sementes, permitindo uma hidratação gradual e controlada sem induzir toxicidade devido à absorção de íons potencialmente tóxicos (TAYLOR et al., 1998). Entretanto, os tratamentos com NaCl (em potenciais iso-osmóticos que os gerados por PEG) não afetaram a embebição nem a germinabilidade e ainda, diminuíram o TMG das sementes.

O potencial osmótico da solução de embebição não afeta a primeira fase de absorção de água pelas sementes, a qual envolve o movimento de água pelo apoplasto; entretanto, na segunda fase, a absorção de água depende do seu movimento através do simplasto (de célula a célula pelo citoplasma e plasmodesmas) e transcelular (através da membrana plasmática) o qual é determinado pela diferença de potencial osmótico da semente e do meio (BEWLEY; BLACK, 1994). Ao contrário do PEG, o NaCl pode atravessar livremente as membranas celulares, assim como observado pelo aumento na concentração de  $\text{Na}^+$  nas sementes tratadas com NaCl (Fig. 4), ao menos que um mecanismo ativo previna o acúmulo de íons (KATEMBE et al., 1998).

O acúmulo de íons ( $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ) nas sementes poderia ser responsável pela diminuição do diferencial osmótico entre o interior da semente e a solução de embebição. Entretanto, levando-se em conta a quantidade de  $\text{Na}^+$  observada nas sementes (Fig. 4), a absorção de íons não seria suficiente para garantir a mesma taxa de absorção de água entre sementes não tratadas e tratadas com NaCl (Fig. 1). Todavia, sabe-se que o movimento intra e intercelular de água nas células vegetais é mediado por aquaporinas, uma classe de *water channel proteins* (GAO et al., 1999). Em diferentes órgãos vegetais o aumento na expressão, atividade e/ou concentração de aquaporinas tem sido observada em resposta ao NaCl mas não ao PEG (KSHETRIMAYUM et al., 2017), o que tem sido positivamente relacionado à menor sensibilidade de sementes ao estresse salino (GAO et al., 1999; KSHETRIMAYUM et al., 2017). Desta forma, uma possível explicação para a ausência de efeito do NaCl na taxa de absorção de água pelas sementes seria uma maior atividade de aquaporinas. Entretanto, essa hipótese deve ser melhor estudada. De toda maneira, apesar de não afetar o processo de embebição, efeitos tóxicos devido ao acúmulo de íons  $\text{Na}^+$  nas sementes seriam esperados (Fig. 4), o que resultariam em menor germinabilidade (JOSÉ et al., 2016). Por isso, visando compreender o efeito do NaCl na fisiologia das sementes, foi investigado o metabolismo oxidativo e respiratório durante as etapas iniciais da germinação.

A interação da germinação com fatores ambientais está intimamente relacionada ao metabolismo oxidativo em sementes (GOMES; GARCIA, 2013). As EROS, como por exemplo o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), em conjunto com os hormônios vegetais, têm papel importante no processo germinativo, atuando na mobilização de reservas, enfraquecimento do endosperma, proteção contra

patógenos e na morte celular programada (GOMES; GARCIA, 2013) e o acúmulo de  $H_2O_2$  nas sementes pode promover a germinação em condições de estresses bióticos e abióticos (BAILLY, 2019). Em condições salinas, por exemplo, o acúmulo de  $H_2O_2$  propiciou a germinação de sementes de *A. thaliana* (ORTIZ-ESPÍN et al., 2017). Similarmente, nós também observamos aumento na concentração de  $H_2O_2$  em sementes expostas a NaCl e PEG (Fig. 2). Assim como nas sementes de *A. thaliana* (ORTIZ-ESPÍN et al., 2017), o acúmulo de  $H_2O_2$  nas sementes expostas ao NaCl não foi acompanhado por danos oxidativos, como evidenciado pelo nível similar de peroxidação lipídica (conteúdo de MDA) nas sementes do tratamento controle e expostas ao sal (Fig. 2). Ao contrário, sementes tratadas com PEG apresentaram concentrações de  $H_2O_2$  muito maiores que aquelas tratadas com NaCl, e nessas sementes, foi observado aumento nas concentrações de MDA (Fig. 2) bem como diminuição da germinabilidade (em potenciais  $\leq -0,247$  MPa) e atraso da germinação (maior TMG) (Fig. 1). A diminuição do tempo médio de germinação (Fig. 1B) associado à ausência de efeitos do sal na germinabilidade (Fig. 1A) e peroxidação lipídica (Fig. 2) sugere que a quantidade de EROS acumulada nas sementes expostas ao sal tem efeito positivo na germinação. Quando em concentrações fisiológicas, o acúmulo de EROS pode favorecer a germinação, auxiliando, por exemplo, na mobilização de reservas. As EROS auxiliam na quebra de polissacarídeos, ácidos nucleicos, ácidos graxos e promovem carbonilação de proteínas, o que auxilia na mobilização (GOMES; GARCIA, 2013), e diminui a energia necessária no metabolismo destas moléculas (GOMES et al., 2019). Entretanto, quando em excesso, como no caso das sementes expostas ao PEG, as EROS promovem danos oxidativos que previnem o metabolismo e desenvolvimento correto do embrião (BAILLY, 2019). Durante a germinação, portanto, as concentrações de EROS devem ser mantidas sob controle, caso contrário, essas moléculas deixam de ser sinalizadoras e passam a ser danosas à germinação. Para tal, as plantas contam com uma maquinaria antioxidante nas quais as enzimas ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) estão envolvidas na limpeza de  $H_2O_2$ . Neste contexto, ao menos às 6 horas após a sementeira, nota-se um aumento da atividade da APX em sementes expostas ao NaCl, que não é observado em sementes expostas ao PEG (Fig. 2). A ativação da APX em sementes expostas ao sal, poderia, ao menos em parte, explicar porque as concentrações de  $H_2O_2$  nessas sementes não chegaram aos níveis observados nas sementes expostas ao PEG.

Estudos têm demonstrado o papel central desta enzima em prevenir danos oxidativos em sementes expostas a condições adversa (GOMES et al., 2013, 2019). Porém, além de diferenças no processo de limpeza, sementes expostas ao NaCl e PEG podem também diferir em nível de processo de formação de EROS – motivo pelo qual foi investigado a atividade de enzimas mitocondriais nas sementes.

Após a embebição e com a reativação do metabolismo, as EROS começam a ser produzidas em compartimentos celulares como cloroplastos, mitocôndrias, e pela atividade da NADPH oxidase que gera EROS nos apoplastos (BAILLY, 2004). Entretanto, o metabolismo respiratório é o principal responsável pela geração de EROS, principalmente oriundos da redução do  $O_2$  por elétrons passando pela CTE mitocondrial (EL-MAAROUF-BOUTEAU; BAILLY, 2008). O aumento na atividade das enzimas da CTE mitocondrial, como visto em sementes expostas ao NaCl (Fig. 3), portanto, garante maior produção de EROS, que por sua vez, promove a germinação das sementes (MA et al., 2019). A absorção de sal (Fig. 4) e não o estresse osmótico, deve ser a responsável pela promoção da atividade respiratória, uma vez que aumento na atividade das enzimas mitocondriais não foi visto em sementes expostas ao PEG (Fig. 3). De fato, as enzimas da CTE mitocondrial são muito mais sensíveis ao componente iônico que o osmótico do estresse salino (JACOBY et al., 2011). Aumentada atividade dos complexos da CTE mitocondrial em plantas expostas a  $MgCl_2$  e KCl também foi observada (KRAB et al., 2000). Desta forma, a salinidade altera a taxa com a qual os complexos da CTE provêm ou aceitam elétrons, podendo causar maior nível de redução de alguns complexos, o qual é manifestado na perda de elétrons para  $O_2$  e consequente formação de EROS (JACOBY et al., 2011). Além do possível efeito benéfico do acúmulo de EROS, o aumento na taxa respiratória também acarreta em maior produção de ATP, vital para o processo germinativo, ajustamento osmótico e tolerância à salinidade (YEO, 1983).

Por outro lado, o decréscimo da atividade das enzimas da CTE mitocondrial em sementes expostas ao PEG pode estar relacionado ao processo de embebição das sementes: a diminuição no conteúdo hídrico das sementes à partir das 7 h após a semeadura foi acompanhada pela redução na atividade das enzimas da CTE (Fig. 1A e 3). A menor disponibilidade hídrica, deve, portanto, limitar o metabolismo das sementes. Pode-se argumentar que com o decréscimo na atividade mitocondrial deveria ser acompanhado por menor produção de EROS. Entretanto, o déficit



hídrico diminui a atividade mitocondrial não por um efeito direto nos complexos da CTE, mas pela limitação na produção de substratos usados em suas reações (JACOBY et al., 2011). Uma vez limitada, o funcionamento inadequado da CTE mitocondrial induz uma superprodução de EROS. Essa hipótese é suportada pelo fato de que a enzima citrato sintase não foi afetada em sementes expostas ao PEG (Fig. 3). Dessa forma, a diminuição da atividade dos Complexos I, III e IV (que prejudica o fluxo normal de elétrons) em sementes causa desvio de elétrons dos Complexos I e III para o oxigênio, induzindo a formação de EROS (GOMES et al., 2016). Em decorrência da ineficiência do sistema antioxidante, EROS são acumuladas e danos oxidativos ocorrem, o que retarda e/ou diminui a germinação (assim como visto nas sementes tratadas com PEG).

O estresse osmótico e também o salino podem afetar o crescimento e processos essenciais de desenvolvimento dos vegetais. Entre esses processos estão a captação de água, a fotossíntese, a síntese de proteínas e o metabolismo energético e lipídico, o que pode acarretar na redução do crescimento, desenvolvimento, produtividade e sobrevivência das plantas (MANAF; ZAYED, 2015). O menor crescimento observado nas plântulas sob as condições de restrição hídrica (PEG) em relação às tratadas com sal pode, assim como nas sementes, estar relacionado a diferenças na expressão e atividade de aquaporinas. Entretanto, ao contrário da germinação, em concentrações  $\geq 75$  mM o sal foi deletério ao crescimento. O acúmulo de sais nos tecidos vegetais implica em inúmeras alterações no metabolismo vegetal, tanto no âmbito fisiológico, quanto no anatômico e bioquímico, acarretando, dentre outras, em diminuição na expansão da parede celular e restrição da assimilação de  $\text{CO}_2$  (SILVEIRA et al., 2010). Tais efeitos poderiam explicar a redução do crescimento das plântulas expostas as maiores concentrações de NaCl. Desta forma, a salinização do solo pode se tornar uma séria limitação à produção agrícola de culturas importantes como o feijão-caupi. Uma vez que concentrações tão elevadas quanto 288 mM de NaCl já foram observadas em solos agrícolas (FAO; ITPS, 2015; PEREIRA et al., 2019), e que estas tendem a aumentar com os incrementos na temperatura terrestre nos próximos anos (NOAA, 2019; JAMIL et al., 2011), o desenvolvimento de técnicas que visem atenuar o estresse iônico e osmótico em culturas agrícolas são de extrema urgência para a manutenção da segurança alimentar.

## 2.5. CONCLUSÃO

A germinação de sementes de *Vigna unguiculata* cv. BRS Imponente não é afetada pelo estresse salino ( $\leq 100$  mM NaCl;  $\Psi_o > -0,495$  MPa). A tolerância das sementes ao sal se deve ao estímulo da atividade das enzimas da CTE mitocondrial e à regulação do conteúdo de EROS, que atuam como sinalizadores do processo germinativo. Entretanto, o componente osmótico da salinidade demonstrou efeito deletério a germinabilidade ( $\Psi_o$  PEG  $< -0,247$  MPa). A restrição da embebição pela diminuição da absorção de água pela semente resulta em diminuição da atividade respiratória bem como no acúmulo de excessivas concentrações de EROS as quais induzem estresse oxidativo, retardando a germinação. Ao contrário do observado para a germinação, concentrações superiores a 50 mM de NaCl inibiram o crescimento das plântulas, o que pode acarretar em diminuição do estabelecimento e relativa perda de produtividade da cultura. Desta forma, estudos para determinação da tolerância a salinidade não devem ser desenvolvidos apenas pela avaliação da germinação de sementes (NABI et al., 2017; RAVELOMBOLA et al., 2017), uma vez que foi observado que a tolerância a salinidade varia entre as fases fenológicas da cultura. Nossos resultados também indicam que uma vez elucidado os mecanismos de tolerância a salinidade novas práticas de manejo e/ou melhoramento de cultivares podem ser desenvolvidas a fim de garantir a produção em terras salinizadas, visto que tal condição tende a aumentar com o incremento na temperatura terrestre nos próximos anos.

## 2.6. REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, A. Y. Md et al. Modeling soil salinity using direct and indirect measurement techniques: A comparative analysis. **Environmental Development**, [s. l.], v. 29, n. September 2017, p. 67–80, 2019.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, [s. l.], v. 105, p. 121–126, 1984.
- BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, [s. l.], v. 14, p. 93–107, 2004.
- BAILLY, C. The signalling role of ROS in the regulation of seed germination and dormancy. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 476, n. July, p. 3019–3032, 2019.
- BARROCA, M. V. **Determinação e conversão da condutividade elétrica do solo em função da composição da solução salina e umidade volumétrica do solo**. 2019. Universidade Federal do Paraná, [s. l.], 2019.
- BATISTA, N. A. S. et al. Comunicação Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de feijão-caupi pelo teste de condutividade elétrica. **Revista Ceres**, [s. l.], v. 59, n. 4, p. 550–554, 2012.
- BIANCHETTI, A.; AMARAL, E. Dia médio e velocidade de germinação de sementes de Cebola (*Allium cepa*, L.). **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, [s. l.], v. 13, n. Brasil 1967, p. 33–44, 1978.
- BIRCH-MACHIN, M. A., HOWELL, N., TURNBULL, D. M. Identification of mitochondrial dysfunction at coupling site II. In: Lashand, H., Jones, D.P. (Eds.), **Methods in Toxicology**. Academic Press, San Diego. pp. 324 – 328, 1993a.
- BIRCH-MACHIN, M. A., JACKSON, S., KLER, R. S., TURNBULL, D. M. Study of skeletal muscle mitochondrial dysfunction. In: Lashand, L.H., Jones, D.P. (Eds.), **Methods in Toxicology**. Academic Press, San Diego, pp. 58 - 59. 1993b.
- BEWLEY DJ, BLACK M. 1994. **Seeds: Physiology of development and germination**. New York: Plenum Press
- BLUMWALD, E. Sodium transport and salt tolerance in plants. **Current Opinion in Cell Biology**, [s. l.], v. 12, p. 431–434, 2000.
- BOUKAR, O. et al. **Cowpea**. New York: Springer Science, 2015.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 254, p. 248–254, 1976.
- NOAA, CENTRO AMERICANO DE INFORMAÇÃO AMBIENTAL, estado do clima: relatório climático global de setembro de 2019, publicado on-line em outubro de 2019, recuperado em 15 de outubro de 2019 em <https://www.ncdc.noaa.gov/sotc/global/201909/supplemental> / página-1.

COELHO, J. B. M. et al. Ponto de murcha permanente fisiológico e potencial osmótico de feijão caupi cultivado em solos salinizados. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, [s. l.], v. 18, n. 7, p. 708–713, 2014.

EL-MAAROUF-BOUTEAU, H.; BAILLY, C. Oxidative signaling in seed germination and dormancy. **Plant Signaling & Behavior**, [s. l.], n. March, p. 175–182, 2008.

ESTORNELL, E. et al. Assay conditions for the mitochondrial NADH : coenzyme Q oxidoreductase. **Federation of European Biochemical Societies**, [s. l.], v. 332, n. 1,2, p. 127–131, 1993.

FAO; ITPS. Status of the World's Soil Resources. **Journal of Genetics**, [s. l.], 2015.

FAROOQ, M. et al. Plant Physiology and Biochemistry Effects, tolerance mechanisms and management of salt stress in grain legumes. **Plant Physiology et Biochemistry**, [s. l.], v. 118, p. 199–217, 2017.

FERNANDES, J. D. et al. Alterations in soil salinity with the use of different biochar doses. **Revista de Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 89–98, 2019.

FREIRE, M. B. G. S. et al. Agrupamento de Solos Quanto à Salinidade no Perímetro Irrigado de Custódia. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, [s. l.], v. 18, n. January, p. s86–s91, 2014.

GAO, Y. et al. Characterization and expression of plasma and tonoplast membrane aquaporins in primed seed of *Brassica napus* during germination under stress conditions. **Plant Molecular Biology**, [s. l.], v. 40, p. 635–644, 1999.

GHEYI, H. R. et al. **Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados**. [s.l: s.n.].

GOMES, M. P. et al. Modulation of *Dimorphandra wilsonii* Rizz seed germination through H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in response to Zn interference of the mitochondrial electron transport chain. **Environmental and Experimental Botany**, [s. l.], v. 128, p. 51–58, 2016.

GOMES, M. P. et al. The system modulating ROS content in germinating seeds of two Brazilian savanna tree species exposed to As and Zn. **Acta Physiol Plant**, [s. l.], v. 35, p. 1011–1022, 2013.

GOMES, M. P. et al. Effects of Ciprofloxacin and Roundup on seed germination and root development of maize. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 651, n. October 2018, p. 2671–2678, 2019.

GOMES, M. P.; GARCIA, Q. S. Reactive oxygen species and seed germination. **Biologia**, [s. l.], v. 68, n. 3, p. 351–357, 2013.

HODGES, D. M. et al. Antioxidant compound responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines. **Physiologia Plantarum**, [s. l.], v. 98, p. 685–692, 1996.

JACOBY, R. P.; TAYLOR, N. L.; MILLAR, A. H. The role of mitochondrial respiration in salinity tolerance. **Trends in Plant Science**, [s. l.], v. 16, n. 11, p. 614–623, 2011.

JAMIL, A. et al. Gene expression profiling of plants under salt stress. **Critical Reviews in Plant Sciences**, [s. l.], v. 30, n. 5, p. 435–458, 2011.

JENNER, H. L. et al. NAD Malic enzyme and the control of carbohydrate metabolism in potato tubers. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 126, n. 1139–1149, 2001.

JOSÉ, A. C. et al. Influence of priming on *Eucalyptus* spp seeds' tolerance to salt stress. **Journal of Seed Science**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 329–334, 2016.

KATEMBE, W.; UNGAR, I. A.; MITCHELL, J. P. Effect of salinity on germination and seedling growth of two *Atriplex* species (Chenopodiaceae). **Annals of Botany**, [s. l.], v. 82, p. 167–175, 1998.

KRAB, K. et al. Identification of the site where the electron transfer chain of plant mitochondria is stimulated by electrostatic charge screening. **European Journal of Biochemistry**, [s. l.], v. 876, n. October 1999, p. 869–876, 2000.

KSHETRIMAYUM, E. et al. Regulation of seed germination and the role of aquaporins under abiotic stress. **International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 607–615, 2017.

MA, W. et al. Mitochondrial small heat shock protein mediates seed germination via thermal sensing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 1, p. 1–6, 2019.

MADEIRA, V.M.C., Antunes-Madeira, M.C., Carvalho, A.P., 1974. Activation energies of the ATPase activity of sarcoplasmic reticulum. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 58, 897-904.

MAIA, J. M. et al. Activities of antioxidant enzymes and root growth inhibition in cowpea seedlings exposed to different salt levels. **Acta Botanica Brasilica**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 342–349, 2012.

MANAF, H. H.; ZAYED, M. S. Productivity of cowpea as affected by salt stress in presence of endomycorrhizae and *Pseudomonas fluorescens*. **Annals of Agricultural Sciences**, [s. l.], v. 60, n. 2, p. 219–226, 2015.

MARTINS, A. P. L.; REISSMANN, C. B. Material vegetal e as rotinas laboratoriais nos procedimentos químico-analíticos. **Scientia Agraria**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–17, 2007.

- MORAIS, M A. S et al. O NaCl inibe a germinação e a atividade da amilase em duas espécies de feijão. **Revista Nordestina de Ciências Biológicas**, [s. l.], v. 01, n. Abril, p. 50–56, 2018.
- NABI, F. et al. Evaluation of algerian cowpea genotypes for salt tolerance at germination stage. **Advances in Environmental Biology**, [s. l.], v. 11, n. May, p. 79–88, 2017.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant e cell physiol**, [s. l.], v. 22, n. May, p. 867–880, 1981.
- ORTIZ-ESPÍN, A. et al. Mitochondrial AtTrxo1 is transcriptionally regulated by AtbZIP9 and AtAZF2 and affects seed germination under saline conditions. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 68, n. 5, p. 1025–1038, 2017.
- PEREIRA, E. D. et al. Saline stress effect on cowpea beans growth under biofertilizer correction. **Bioscience Journal**, [s. l.], v. 35, n. 5, p. 1328–1338, 2019.
- PEREIRA, T. S. et al. Tolerance to water deficit in cowpea populations resulting from breeding program: detection by gas exchange and chlorophyll fluorescence. **Indian Journal of Plant Physiology**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 171–178, 2016.
- RAVELOMBOLA, W. S. et al. Evaluation of salt tolerance at germination stage in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. **Hort Science**, [s. l.], v. 52, n. 9, p. 1168–1176, 2017.
- SILVEIRA, J. A. G. et al. **Mecanismos biomoleculares envolvidos com a resistência ao estresse salino em plantas**. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade, [s. l.], 2010.
- TAYLOR, A. G. et al. Seed enhancements. **Seed Science Research**, [s. l.], v. 8, n. May, p. 245–256, 1998.
- VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants Protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, [s. l.], v. 151, p. 59–66, 2000.
- VILLELA, F. A.; FILHO, L. D.; SEQUEIRA, E. L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de Polietileno glicol 6000 e da temperatura. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, [s. l.], v. 26, p. 1957–1968, 1991.
- YAMASHITA, O. M. et al. Fatores que afetam a germinação de sementes e emergência de plântulas de arruda (*Ruta graveolens* L.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 202–208, 2009.
- YEO, A. R. Salinity resistance: Physiologies and prices. **Physiologia Plantarum**, [s. l.], v. 58, p. 214–222, 1983.

### 3. CAPÍTULO II: AUMENTO DA TOLERÂNCIA AO ESTRESSE SALINO EM PLANTAS DE FEIJÃO-CAUPI INOCULADAS COM O FUNGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR *Rhizophagus clarus*

#### RESUMO

O declínio das áreas agricultáveis, bem como, o incremento anual na população mundial, motivam a investigação de práticas agrícolas que possam atenuar o efeito da degradação do solo pela salinidade na produtividade das culturas e assim promover a segurança alimentar principalmente em áreas onde o efeito da salinidade é mais pronunciado. Neste estudo avaliou-se os efeitos da inoculação do fungo micorrízico arbuscular (FMA) *Rhizophagus clarus* na produtividade de plantas de *Vigna unguiculata* cv. BRS Imponente em resposta à salinidade. A inoculação com FMA promoveu redução do estresse iônico, medido pelo menor conteúdo de sódio e relação  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  nas folhas; melhor regulação do estado nutricional devido a maior absorção de fósforo e potássio e maior acúmulo de biomassa de folhas. A produtividade de grãos também foi aumentada em plantas inoculadas com o FMA submetidas a concentrações crescentes de NaCl. Desta forma, indica-se a inoculação com FMA como prática atenuadora do estresse salino visando maior performance de plantas de caupi quando cultivadas em solos salinizados.

Palavras-chave: Salinidade. Estresse iônico. Nutrição de plantas. Segurança alimentar.

#### 3.1. INTRODUÇÃO

Leguminosas desempenham um papel importante na contribuição para a segurança alimentar em todo o mundo. Essa importância se deve tanto pela composição proteica dos grãos, quanto pela rusticidade e adaptabilidade das plantas a diferentes condições edafoclimáticas (FAO, 2016). Um exemplo disso é o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Essa leguminosa apresenta entre 20 - 39 % de proteína na composição de seus grãos (GONÇALVES et al., 2016), e tem sido amplamente produzida em diferentes regiões em todo o mundo (GONÇALVES et al., 2016). Sua importância socioeconômica se deve principalmente ao seu plantio em localidades sujeitas a déficit hídrico, representando renda e fonte alimentar para a população, geralmente de baixa renda, que habita essas regiões (ENYIUKWU et al., 2018).

Vinculado ao aumento da temperatura terrestre, o aumento da salinização do solo é um problema de escala mundial (ABDULLAH et al., 2019), afetando uma



área de um bilhão de hectares (FAO; ITPS, 2015). Além disso, estima-se que até 2050, metade das áreas agrícolas estarão salinizadas (JAMIL et al., 2011). A salinidade é um dos impactos abióticos mais restritivos à produção agrícola, por causar estresse para os vegetais no âmbito do controle osmótico, iônico e/ou oxidativo (SILVEIRA et al. 2010). Em consequência, alterações fisiológicas e anatômicas são observadas em plantas sob estresse salino (SINGH et al., 2014). A restrição hídrica, nutricional, e o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROS) induzidos pelo excesso de sal, é responsável por alterações no conteúdo de pigmentos e estruturas celulares, afetando diretamente a fotossíntese e consequentemente, o crescimento e a produtividade das culturas (SILVEIRA et al. 2010).

Algumas plantas desenvolveram alguns mecanismos fisiológicos e anatômicos para tolerar a salinidade. Estes mecanismos consistem em exclusão do sal por impedimentos à entrada do sódio; eliminação do sal relacionada à extrusão do sódio por estruturas especializadas; aumento da suculência das folhas para diminuir a concentração dos íons tóxicos e redistribuição de sal relacionado à distribuição de sódio e cloro para os tecidos radiculares (ACOSTA-MOTOS et al., 2017). Entretanto, mesmo em plantas consideradas tolerantes, a salinidade do solo ainda induz decréscimo de produtividade (TAGLIAFERRE et al., 2018). Neste contexto, estudos têm sido desenvolvidos visando à promoção de práticas que possam minimizar o estresse e/ou aumentarem a tolerância de plantas ao excesso de sais nos solos (MANAF; ZAYED, 2015), o que, no caso das cultivadas, pode diminuir a ameaça à sustentabilidade agrícola. Dentre essas práticas, a inoculação das cultivares com microrganismos simbiotes, como por exemplo os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), tem sido área de investigação, visto que os FMA podem limitar a absorção de íons potencialmente tóxicos e otimizar a absorção de nutrientes, auxiliando na manutenção da homeostase iônica, melhorando a captação e a eficiência do uso da água (KAPOOR et al., 2019). Além disso, pela indução da atividade de sistemas antioxidantes e modulação do perfil de fitohormônios, os FMA são capazes de minimizar os efeitos deletérios dos sais no crescimento e desenvolvimento dos vegetais (KAPOOR et al., 2019).

Desta forma, dada sua importância socioeconômica, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos da inoculação do FMA *Rhizophagus clarus* nas respostas de plantas de feijão-caupi cv. BRS Imponente à salinidade. Além da investigação



das características fisiológicas e anatômicas associadas ao estresse salino e à simbiose com o fungo, objetivou-se indicar a inoculação com o FMA como prática promotora da produtividade de feijão-caupi cultivado em solos afetados por sais.

### 3.2. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.2.1. Condições experimentais

Como substrato para o crescimento das plantas, foi utilizado areia e vermiculita (2:1, v:v) autoclavada. Este substrato foi escolhido devido à sua baixa capacidade de troca catiônica (CTC), representando um cenário de total disponibilidade do sal na solução. Dois Kg desse substrato foram acondicionados em vasos plásticos de 5 L, livres de vazão, previamente desinfetados com álcool 70 %. Os vasos receberam 1,4 L de sua respectiva solução salina (0, 25, 50, 75 e 100 mM), correspondente a 100 % da capacidade de campo. NaCl grau HPLC (Sigma-Aldrich, Brasil) foi utilizado para preparação das soluções. Os vasos permaneceram em casa de vegetação (25 °C) e quando alcançada 70 % da capacidade de campo (três dias), procedeu-se os tratamentos com inoculação fúngica e a semeadura.

O inóculo de *Rhizophagus clarus* ([T. H. Nicolson & N. C. Schenck] C. Walker & A. Schüßler, 2010) utilizado foi adquirido junto a Embrapa Agrobiologia (Rio de Janeiro, Brasil). Essa espécie de FMA foi escolhida devido sua alta eficiência em colonizar raízes de *V. unguiculata* (SILVA et al., 2018) O inóculo consistiu de 429 esporos (3,5 g de inóculo) por vaso conforme especificações da bula. Os tratamentos sem inoculação (FMA-) receberam 3,5 g de inóculo autoclavado (127 °C, 30 min). As sementes de *Vigna unguiculata* cv. BRS Imponente, safra 2018, foram adquiridas da empresa Cebal Agro (Paraná, Brasil). O lote de sementes apresentou 100 % de viabilidade avaliado pelo teste de tetrazólio (GOMES et al., 2019). Após desinfecção superficial com hipoclorito de sódio (1,5 %) por dois minutos e lavagem com água deionizada, cinco sementes foram semeadas em cada vaso.

Os vasos foram mantidos em casa de vegetação (25 °C; 500  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Após a emergência das plântulas (sete dias) foi procedido o desbaste, mantendo-se três plantas saudáveis e de altura similar em cada vaso. O substrato foi mantido a 70 % da capacidade de campo, verificada diariamente, e, caso necessário, corrigida através da adição de água destilada. A nutrição das plantas foi

suprida através da aplicação semanal (300 mL) de solução completa de (HOAGLAND; ARNON, 1950). No estágio inicial da cultura, primeira e segunda semanas, a solução foi diluída a  $\frac{1}{4}$  e a  $\frac{1}{2}$  força, respectivamente. Da terceira semana em diante a solução nutritiva foi aplicada em força total. O experimento foi conduzido até alcançado o enchimento completo das vagens, estágio R5.

### 3.2.2. Colonização micorrízica

A colonização micorrízica (%) foi determinada pelo método de Giovannetti e Mosse descrito em Dionísio et al. (2016). A colonização foi determinada em microscópio (CarlZeiss, Axiolab re) com lâmina de grid de 5 mm e a porcentagem foi determinada pela equação: (total de raízes colonizadas/total de raízes estudadas) x 100.

### 3.2.3. Concentração de prolina

A concentração de prolina foi extraído de 0,1 g de folha em solução aquosa de ácido sulfosalicílico a 3% em seguida foi procedida a reação com a adição de ácido acético glacial e ninidrina ácida, e exposição a temperatura de 100 °C por uma hora. A determinação foi desenvolvida em espectrofotômetro UV-VIS Espectrofotômetro de microplacas Multiskan TMGO (Thermo Scientific, USA) pela absorbância a 520 nm (modificado de BATES et al., 1973).

### 3.2.4. Avaliações anatômicas

As avaliações anatômicas foram efetuadas nas mesmas folhas utilizadas para determinação da concentração de prolina. O material foi fixado em FAA (formaldeído + ácido acético + álcool etílico 70% 5: 5: 90 I / I / I) por 72 h e depois armazenado em álcool etílico 70 % Johansen (1940). Após a desidratação em uma série etílica / butílica as amostras foram embebidas em historesina histológica. Cortes transversais com 5  $\mu$ m foram feitos utilizando um micrótomo rotativo semiautomático (Olympus CUT 4055). As seções foram coradas com azul de toluidina e as lâminas montadas com bálsamo sintético do Canadá. Todas as lâminas foram examinadas e fotografadas usando um microscópio de luz (CarlZeiss,

Axiolab re) e uma câmera digital (Sony 7.2 Mpix). Para avaliar as características das folhas, o meio-diafragma foi utilizado como referência. Foram avaliadas a espessura da lâmina foliar, mesofilo, parênquima lacunoso e paliçádico, bem como a espessura da epiderme abaxial e adaxial. As avaliações foram realizadas em três seções / repetição. Os dados de espessura foram obtidos por meio do software Anati Qaunti 2.0 (AGUIAR et al., 2007), com um total de três observações / seção / repetição, compondo 27 medidas para cada estrutura / tratamento avaliado.

### 3.2.5. Avaliações nutricionais

Após a coleta de material para as avaliações anatômicas e bioquímicas, efetuou-se um pool das folhas restantes para as avaliações nutricionais. As folhas foram secas a 65 °C até obter peso constante, e moídas em moinho portátil. 0,50 g de material seco foi digerido em mufla à 500 °C por três horas. Em seguida, foi adicionado 1 mL de HCl 3 M, e novamente as amostras foram aquecidas a 500 °C por três horas de acordo com Martins; Reissmann (2007). Após resfriamento à temperatura ambiente, a extração dos elementos minerais foi feita com a adição de 5 mL de HCl 3 M em chapa aquecedora a 200 °C por 10 minutos. As amostras foram então filtradas em papel filtro laboratorial classificação azul, e tiveram seu volume completado para 50 mL com água destilada. A determinação da concentração dos macronutrientes (P, K, Ca, Mg e S) e dos micronutrientes (Cu, Fe, Mn e Zn) foi realizada por espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES; Varian Inc. modelo 720-ES). A determinação do conteúdo de sódio (Na) foi feita por espectroscopia atômica em fotômetro de chama (Dm-62; Digimed, Brazil). Material de referência (Specsol) com concentrações conhecidas dos elementos, bem como brancos analíticos foram utilizados para controle de qualidade.

A determinação do conteúdo de cloro (Cl) foi feita por titulação, seguindo a metodologia de Mohr descrita por Silva et al. (1991), utilizando-se 1 g de folha. O cloreto foi extraído em nitrato de cálcio ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) 0,085 M, e determinado por nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) 0,0282 M, na presença de cromato de potássio ( $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ) 0,258 M como indicador.

### 3.2.6. Produtividade de grãos e biomassa

Ao final do período experimental, foram colhidas 9 plantas por tratamento, divididas em raízes, folhas e vagens. Foram determinadas a massa fresca e seca da parte aérea (MFPA e MFR) e da raiz (MSPA e MSR), bem como a produtividade de grãos por hectare, tendo como base um total de 250000 plantas ha<sup>-1</sup>. A massa seca do material vegetal foi obtida após a secagem a 65 °C em estufa com entrada forçada de ar.

### 3.2.7. Análises estatísticas

O experimento foi desenvolvido em delineamento inteiramente casualizado com um fatorial duplo composto por diferentes concentrações de sal (0, 25, 50, 75 e 100 mM de NaCl) x FMA (presença, ausência), com três repetições.

As análises estatísticas foram realizadas no software JMP 13.2 (SAS Inst. Inc). Os resultados foram expressos com a média de três repetições. Os dados foram testados quanto à normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Bartlett) e estatisticamente avaliados utilizando-se análise de variância bidirecional. A interação entre a adição de NaCl (0, 25, 50, 75 e 100 mM) e inoculação fúngica (FMA- e FMA+) foram incluídas no modelo. Quando diferenças foram detectadas pela ANOVA, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey All pairs HSD ( $P < 0,05$ ). Para os dados de produtividade de grãos, marcadores anatômicos bem como para o conteúdo de macro e micronutrientes a comparação de média foi feita pelo teste *t* de Student ( $P < 0,05$ ).

## 3.3. RESULTADOS

### 3.3.1. Produção de biomassa e produtividade de grãos

A interação dos fatores apresentou efeito significativo na produção de massa fresca (MF) e seca (MS) da parte aérea (PA) e da raiz (R) (Tab. 3;  $P < 0,05$ ). Em plantas FMA-, foi observado maior acúmulo de MFPA nas concentrações 0 e 75 mM de NaCl em relação as concentrações 50 e 100. Já em plantas FMA+ a concentração de 25 mM promoveu o maior acúmulo de MFPA, sendo semelhante a

concentração 50 e superior às demais concentrações de NaCl. Plantas FMA+ submetidas a concentrações 25 e 50 mM de NaCl apresentaram maior MFPA em relação aos seus controles não-inoculados (FMA-). Em plantas FMA- não houve efeito das concentrações salinas no conteúdo de MSPA. Entretanto, em plantas FMA+ a concentração 25 mM resultou em maior acúmulo de MSPA em relação as concentrações 75 e 100 mM de NaCl. Plantas FMA+ submetidas a concentração de 25 mM de NaCl apresentaram maior MSPA em relação aos seu controle não-inoculado.

Menor MFR foi observada em plantas FMA- submetidas a 100 mM de NaCl. Em plantas FMA+ redução da MFR foi observada em plantas submetidas ao controle e a concentração 100 mM em relação a concentração 50 mM. O sal não afetou negativamente a MSR, independente da inoculação. Enquanto a inoculação diminuiu a MSR em relação às plantas não-inoculadas (0, 75 e 100 mM), quando submetidas a 25 e 50 mM de NaCl, tal redução não foi observada (Tab. 5;  $P < 0,05$ ).

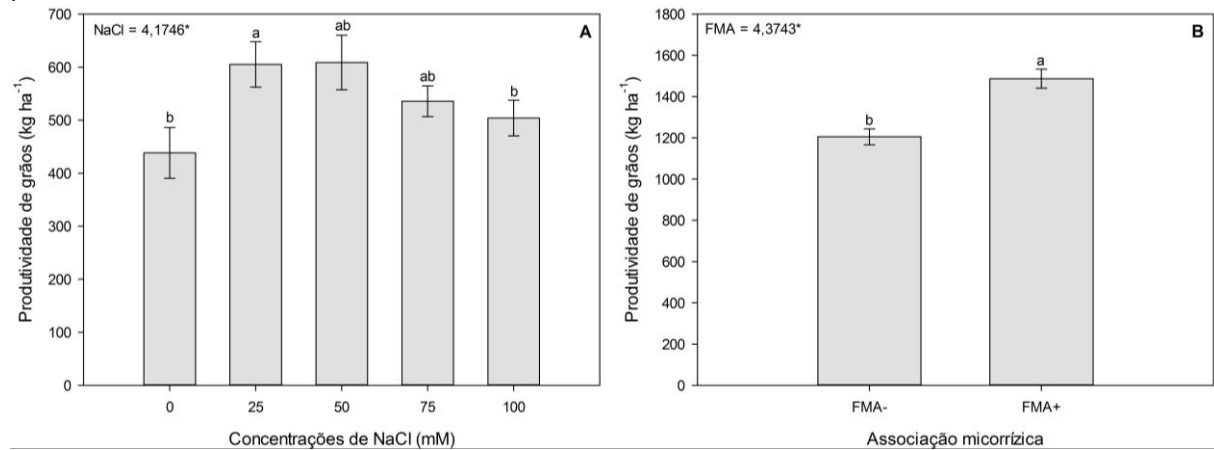
Tabela 3. Produtividade de biomassa fresca e seca da parte aérea (MFPA e MSPA) e de raízes (MFR e MSR) de *V. unguiculata* cv. BRS Imponente sob diferentes concentrações de NaCl, com e sem a inoculação com *R. clarus*, expressas em g planta<sup>-1</sup>. Letras maiúsculas representam diferença entre a inoculação (FMA- e FMA+) dentro da mesma concentração salina, enquanto que letras minúsculas, indicam diferença entre as concentrações de NaCl dentro da ausência (FMA-) e presença (FMA+) de inoculação. Para interação significativa entre os fatores, comparados pelo teste de Tukey All pairs HSD ( $P < 0,05$ ).

Concentrações de NaCl (mM)	MFPA		MSPA		MFR		MSR	
	(g planta <sup>-1</sup> )		(g planta <sup>-1</sup> )		(g planta <sup>-1</sup> )		(g planta <sup>-1</sup> )	
	-FMA	+FMA	-FMA	+FMA	-FMA	+FMA	-FMA	+FMA
0	14,49 NSa	14,21 NSbc	2,14 NSns	2,01 NSabc	10,56 Aab	4,87 Bbc	1,35 Ab	0,41 Bbc
25	13,74 Bab	21,25 Aa	2,13 Bns	3,35 Aa	15,54 NSab	11,41 Nsab	1,49 NSa	1,36 NSa
50	13,30 Bbc	17,20 Aab	1,96 NSns	2,32 NSab	14,20 NSab	12,19 NSa	1,36 NSab	1,38 NSa
75	14,48 Aa	11,96 Bcd	2,18 Ans	1,43 Bc	16,77 Aa	8,50 Babc	1,78 Aa	0,76 Bab
100	13,20 Abc	11,61 Bd	2,06 Ans	1,53 Bbc	10,79 NSb	3,59 NSc	1,10 Ab	0,32 Bc

FONTE: O autor (2020)

A interação dos fatores não influenciou significativamente a produtividade de grãos (Fig. 5;  $P < 0,05$ ). Entretanto, a exposição de plantas a concentração de 25 mM de NaCl resultou em maior produtividade de grãos em relação as plantas expostas ao tratamento controle e a concentração de 100 mM de NaCl. Plantas FMA+ apresentaram maior produtividade de grãos em relação as plantas não inoculadas (Fig. 5;  $P < 0,05$ ).

Figura 5. Produtividade acumulada de grãos de plantas de *V. unguiculata* cv. BRS Imponente expostas a concentrações crescentes de NaCl (A) com e sem inoculação por *R. clarus* (B). Letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos. As médias foram comparadas pelo teste t de Student ( $P < 0,05$ ). As barras significam média  $\pm$  DP das repetições. \* significativo a 5% de probabilidade.



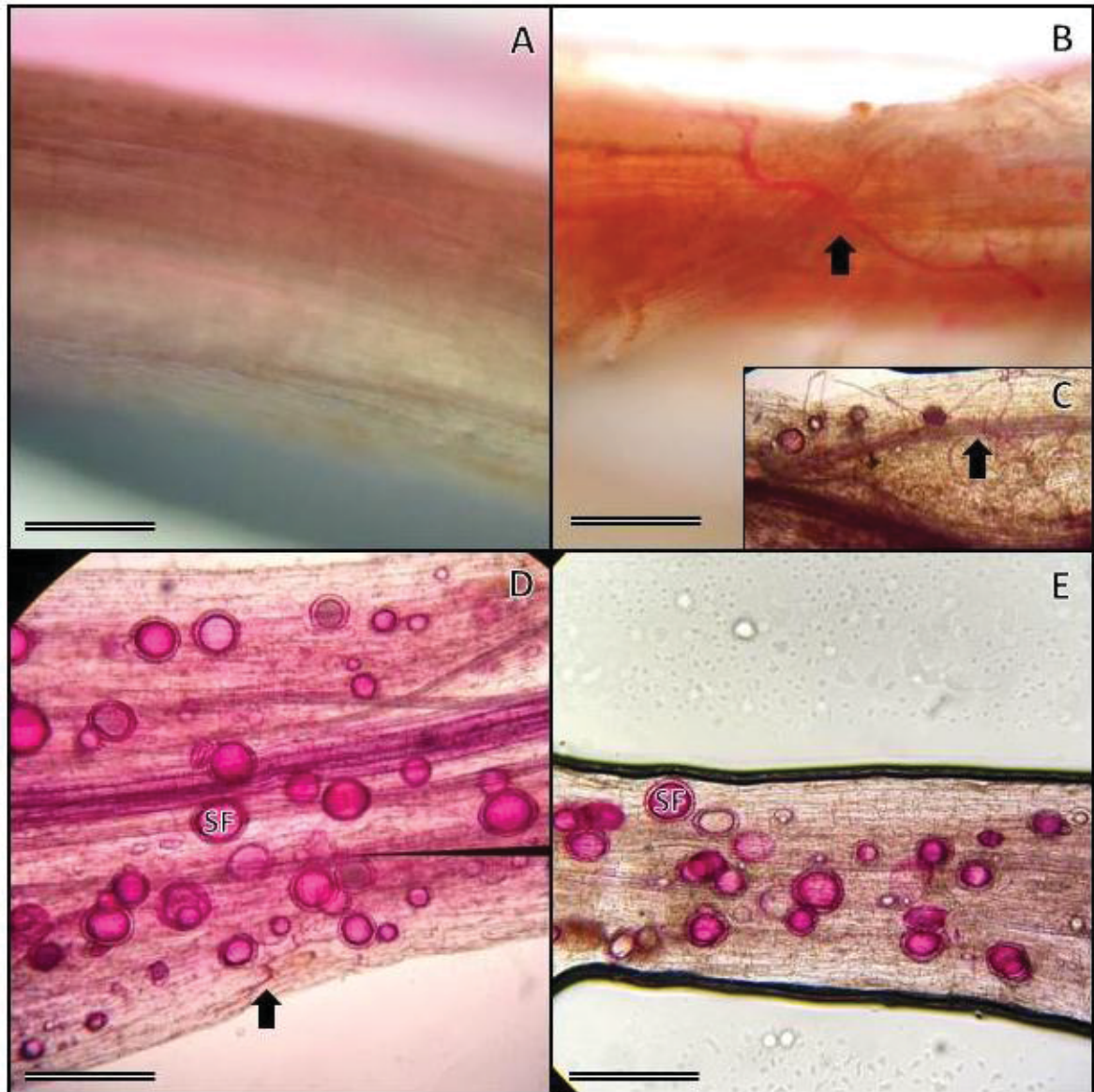
FONTE: O autor (2020)

### 3.3.2. Colonização micorrízica

Foi observada interação significativa ( $P < 0,05$ ) entre as concentrações de NaCl no substrato e a inoculação com FMA. A porcentagem de estruturas fúngicas em tecidos radiculares (colonização micorrízica) decresceu com a salinidade ( $P < 0,05$ ) e foi maior nos tratamentos com inoculação (FMA+) em relação aos seus respectivos controles sem inoculação (FMA-) (Fig. 6 e 7).

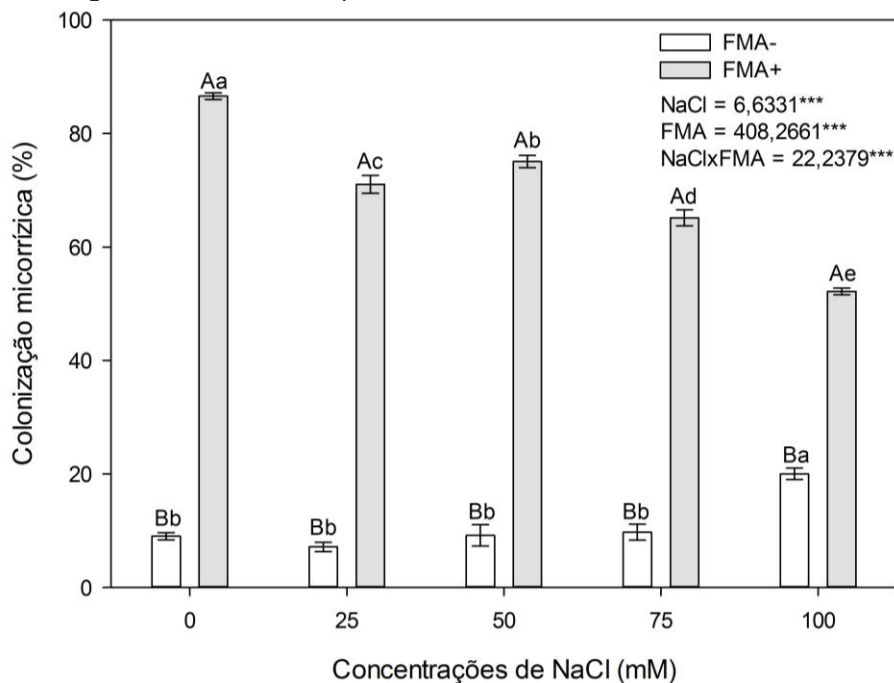


Figura 6. Estruturas fúngicas (Setas indicam hifa; SF – Esporo fúngico) no interior de raízes de *V. unguiculata* cv. BRS Imponente inoculado com *R. clarus*. A – Tratamento controle (0 mM NaCl + FMA-); B, C e D – 0 mM NaCl + FMA+; E – 100 mM NaCl + FMA+). Escala de 100  $\mu$ m.



FONTE: O autor (2020)

Figura 7. Colonização micorrízica (%) em plantas de *V. unguiculata* cv. BRS Imponente expostas a concentrações crescentes de NaCl com e sem inoculação por *R. clarus*. Letras maiúsculas indicam diferença entre a inoculação (FMA- e FMA+) dentro das mesmas concentrações de NaCl (0, 25, 50, 75 e 100 mM), enquanto que letras minúsculas indicam diferença entre as concentrações de NaCl dentro da ausência (FMA-) e presença (FMA+) de inoculação, para interação significativa entre os fatores, comparados pelo teste de Tukey All pairs HSD ( $P < 0,05$ ). As barras significam média  $\pm$  DP de três repetições. \*\*\* significativo a 0,1% de probabilidade.



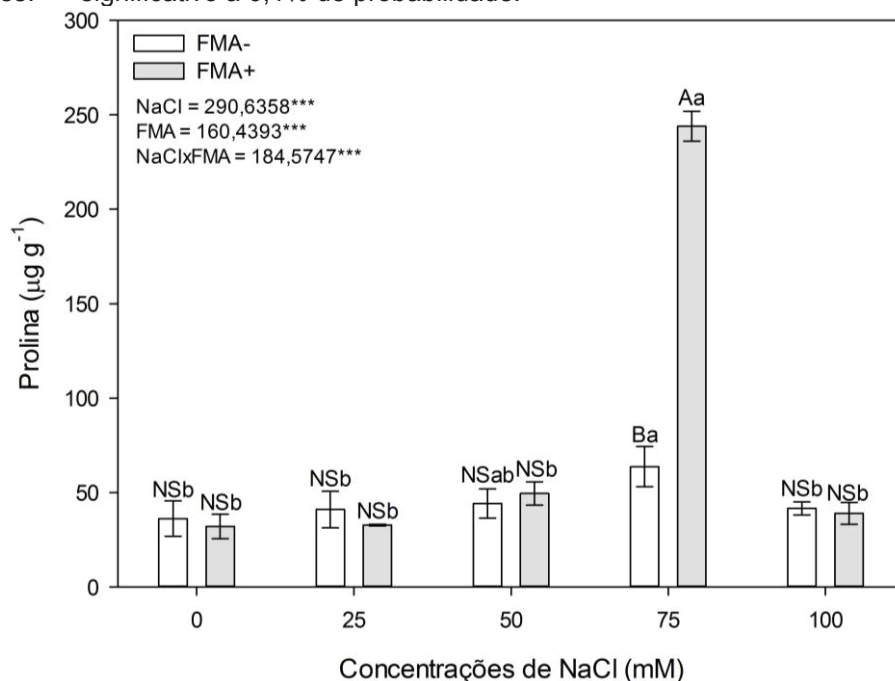
FONTE: O autor (2020)

### 3.3.3. Concentração de prolina

Foi observada interação significativa dos fatores para a concentração de prolina das folhas ( $P < 0,05$ ; Fig. 8). Plantas FMA- apresentaram maior concentração de prolina na concentração de 75 mM, em relação às dos tratamentos com 0, 25 e 100 mM de NaCl. Entre as plantas FMA+, maior concentração de prolina foi observada nas folhas das plantas submetidas a 75 mM de NaCl.



Figura 8. Concentração de prolina em folhas de *V. unguiculata* cv. BRS Imponente expostas a concentrações crescentes de NaCl com e sem inoculação por *R. clarus*. Letras maiúsculas indicam diferença entre a inoculação (-FMA e +FMA) dentro das mesmas concentrações de NaCl (0, 25, 50, 75 e 100 mM), enquanto que letras minúsculas indicam diferença entre as concentrações de NaCl dentro da ausência (FMA-) e presença (FMA+) de inoculação, para interação significativa entre os fatores, comparados pelo teste de Tukey All pairs HSD ( $P < 0,05$ ). As barras significam média  $\pm$  DP de três repetições. \*\*\* significativo a 0,1% de probabilidade.



FONTE: O autor (2020)

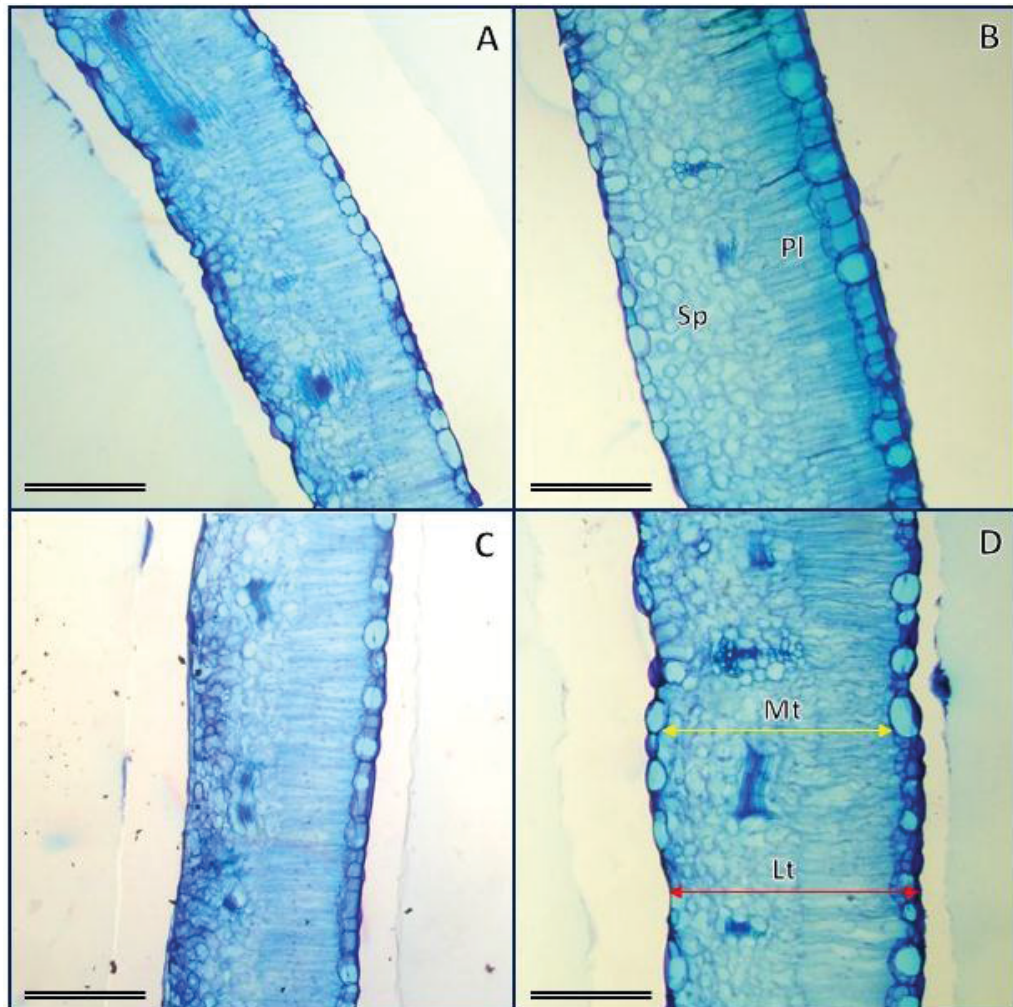
### 3.3.4. Marcadores anatômicos

As concentrações de NaCl no substrato e a associação micorrízica afetaram significativamente a espessura de todos os tecidos estudados, exceto da epiderme abaxial ( $P < 0,05$ ; Fig. 9 e 10). Em plantas FMA-, maior espessura total da folha, espessura do mesófilo e do parênquima lacunoso foi observado em plantas submetidas às concentrações de 75 e 100 mM de NaCl em relação às demais concentrações. Plantas FMA- submetidas a concentrações de 50 e 75 mM de NaCl apresentaram maior espessura da epiderme adaxial em relação ao controle e as da concentração 25 mM ( $P < 0,05$ ; Fig. 10). Já em plantas FMA+, maior espessura foliar e do mesófilo foi observada em plantas do tratamento com 75 mM de NaCl em relação ao controle e as concentrações 25 e 100 mM. A espessura do parênquima lacunoso foi aumentada nas folhas das plantas FMA+ nas concentrações de 50 e 75 mM de NaCl, enquanto que a espessura do parênquima paliçádico foi maior nas folhas das plantas submetidas a 25 mM em relação às do controle e da concentração 100 mM. A espessura da epiderme adaxial foi maior em folhas de

plantas FMA+ expostas a concentração 100 mM de NaCl em relação ao controle ( $P < 0,05$ ; Fig. 10).

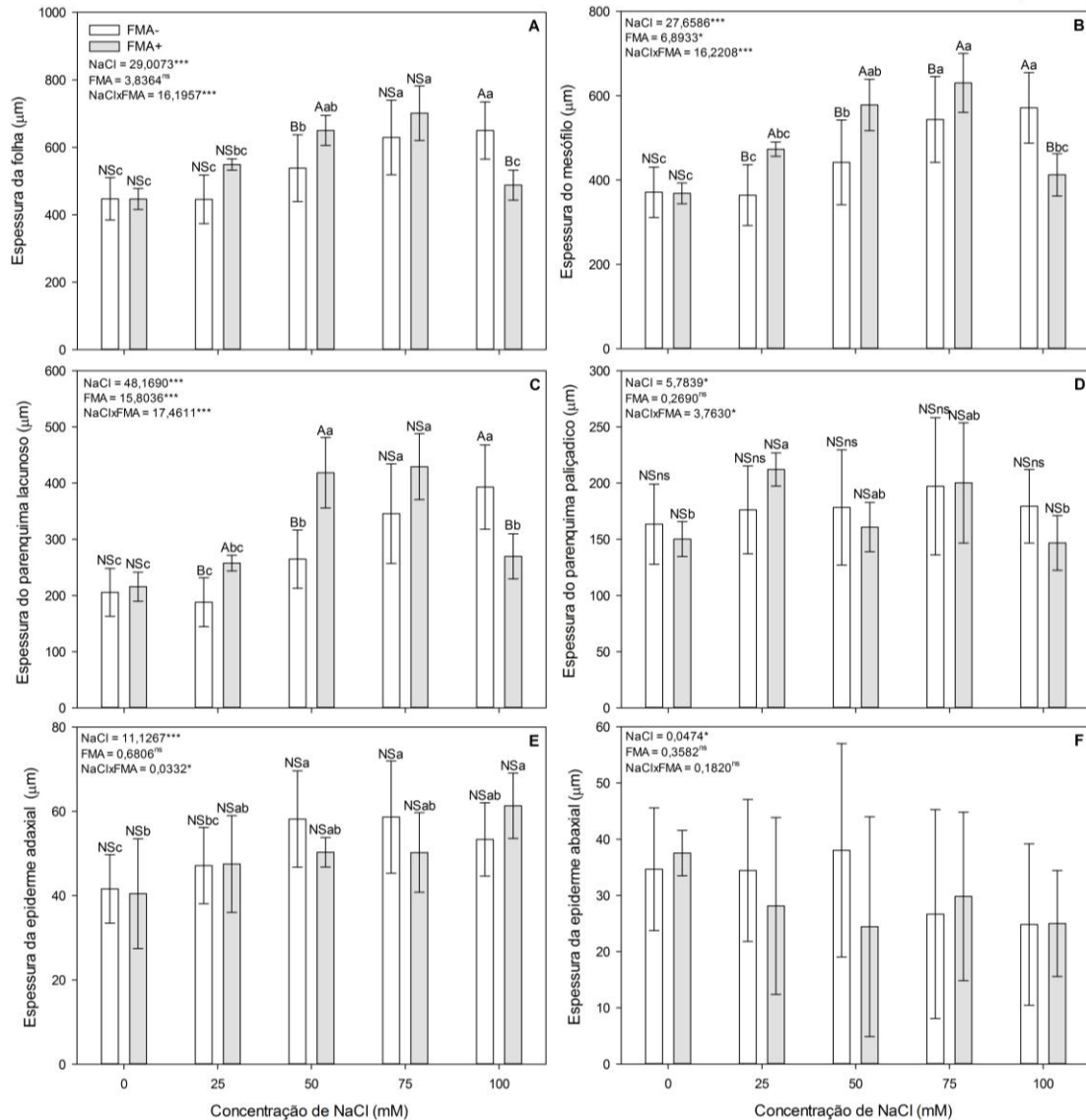
Menor espessura da folha, do mesófilo e do parênquima lacunoso foi observada em plantas FMA+ submetidas a 100 mM de NaCl, em relação às FMA- sob mesma concentração do sal. Ao contrário, plantas inoculadas apresentaram maior espessura da folha (50 mM), do mesófilo (25, 50 e 75 mM) e do parênquima lacunoso (25 e 50 mM) ( $P < 0,05$ ; Fig. 10) em relação às FMA-.

Figura 9. Cortes transversais de folhas de plantas de *V. unguiculata* cv. BRS Imponente expostas a concentrações crescentes de NaCl com e sem inoculação por *R. clarus*. A) 0 mM de NaCl + FMA-; B) 75 mM de NaCl + FMA-; C - 25 mM de NaCl + FMA- e D: 25 mM de NaCl + FMA+. PI – Parênquima paliádico; Sp – Parênquima lacunoso; Mt – Espessura do mesofilo e Lt – Espessura da folha. Escala de 100  $\mu$ m.



FONTE: O autor (2020)

Figura 10. Marcadores anatômicos. A – Espessura da folha; B – Mesófilo; C – Parênquima lacunoso; D – Parênquima paliçádico; E – Epiderme superior e D – Epiderme inferior de folhas de *V. unguiculata* cv. BRS Imponente expostas a concentrações crescentes de NaCl com e sem inoculação por *R. clarus*. Letras maiúsculas indicam diferença entre a inoculação (-FMA e +FMA) dentro das mesmas concentrações de NaCl (0, 25, 50, 75 e 100 mM), enquanto que letras minúsculas indicam diferença entre as concentrações de NaCl dentro da ausência (-FMA) e presença (+FMA) de inoculação, para interação significativa entre os fatores, comparados pelo teste t de Student ( $P < 0,05$ ). As barras significam média  $\pm$  DP das repetições. \* e \*\*\* significativos a 5% e a 0,1% de probabilidade, <sup>ns</sup> não significativo.



FONTE: O autor (2020)

### 3.3.5. Concentração de nutrientes nas folhas

A interação entre os fatores afetou significativamente ( $P < 0,05$ ) a concentração de todos os macronutrientes e micronutrientes, exceto a de enxofre (S) (Tab. 4 e 5), as quais foram significativamente ( $P < 0,05$ ) reduzidas em folhas das plantas expostas a concentrações de NaCl superiores a 25 mM.

A concentração de 25 mM de NaCl resultou em menor concentração de fósforo (P) nas folhas de plantas FMA- em relação as concentrações 75 e 100 mM. Reduções nas concentrações de potássio (K) (nos tratamentos 25, 50 e 100 mM), cálcio (Ca) (em todas as concentrações salinas) e magnésio (Mg) (na concentração 25 mM de NaCl) também foi observada em plantas FMA-. Em plantas FMA+, os tratamentos salinos resultaram em menor concentração de P (todos os tratamentos), de Ca (25, 75 e 100 mM) e Mg (25, 50 e 100 mM) nas folhas. Ao contrário, plantas FMA+ apresentaram maior concentração de K quando submetidas a 75 e 100 mM de NaCl.

A associação micorrízica promoveu incremento na concentração de P (exceto na concentração 25 mM de NaCl), de K em concentrações >25 mM e de Ca na concentração de 50 mM de NaCl em relação aos seus respectivos controles sem associação micorrízica. As concentrações de magnésio nas folhas de plantas inoculadas com FMA foram reduzidas em todas as concentrações salinas.

Em plantas FMA-, a exposição ao sal (independente da concentração) resultou em maior concentração de cobre (Cu) nas folhas. Este comportamento foi observado para ferro apenas na concentração 100 mM; para manganês na concentração 25 mM e para zinco na concentração 75 mM. Já em plantas não inoculadas o aumento da salinidade do substrato ( $\geq 25$  mM de NaCl) acarretou em redução na concentração de cobre, ferro e manganês em suas folhas, bem como, de zinco, exceto na concentração 100 mM.

A associação micorrízica proporcionou incremento de cobre nas folhas de plantas no tratamento controle; de ferro nas concentrações 0, 25 e 75 mM; e de zinco nas concentrações 50 e 100 mM, bem como acarretou em redução na concentração de manganês em todas as concentrações salinas, em relação aos seus respectivos controles sem associação micorrízica ( $P < 0,05$ ; Tab. 5).

Tabela 4. Concentração de macronutrientes, Fósforo (P); Potássio (K); Cálcio (Ca); Magnésio (Mg) e Enxofre (S), em folhas de *V. unguiculata* cv. BRS Imponente sob diferentes concentrações de NaCl, com e sem a inoculação com *R. clarus*. Letras maiúsculas representam diferença entre a inoculação (-FMA e +FMA) dentro das mesmas concentrações de NaCl, enquanto que letras minúsculas indicam diferença entre as concentrações de NaCl dentro da ausência (-FMA) e presença (+FMA) de inoculação, pelo teste t de Student (P<0,05).

Concentrações de NaCl (mM)	P		K		Ca		Mg		S	
					g kg de massa seca <sup>-1</sup>					
	FMA-	FMA+	FMA-	FMA+	FMA-	FMA+	FMA-	FMA+	FMA-	FMA+
0	5,65 Bab	8,50 Aa	35,43 Aa	30,06 Bc	16,14 NSa	16,31 NSa	17,29 Abc	14,56 Ba	3,4	3,57
25	6,39 NSa	6,33 NSc	30,80 Ac	27,42 Bc	14,61 NSb	14,02 NSb	16,59 Ac	12,93 Bb	3,45	3,29
50	5,58 Bab	6,69 Ac	31,91 Bc	35,44 Ab	14,62 Bb	15,87 Aa	18,66 Aa	11,86 Bb	2,36	2,4
75	5,10 Bbc	7,58 Ab	34,65Bab	44,98 Aa	13,70 NSbc	12,90 NSc	17,68 Aabc	15,55 Ba	1,95	2,09
100	4,67 Bc	6,01 Ac	33,19Bbc	44,46 Aa	12,98 Ac	10,35 Bd	17,79 Aab	12,47 Bb	1,7	2,04

FONTE: O autor (2020)

Tabela 5. Concentração de micronutrientes, Cobre (Cu); Ferro (K); Manganês (Mn) e Zinco (Zn), em folhas de *V. unguiculata* cv. BRS Imponente sob diferentes concentrações de NaCl, com e sem a inoculação com *R. clarus*. Letras maiúsculas representam diferença entre a inoculação (-FMA e +FMA) dentro das mesmas concentrações de NaCl, enquanto que letras minúsculas indicam diferença entre as concentrações de NaCl dentro da ausência (-FMA) e presença (+FMA) de inoculação, pelo teste t de Student (P<0,05).

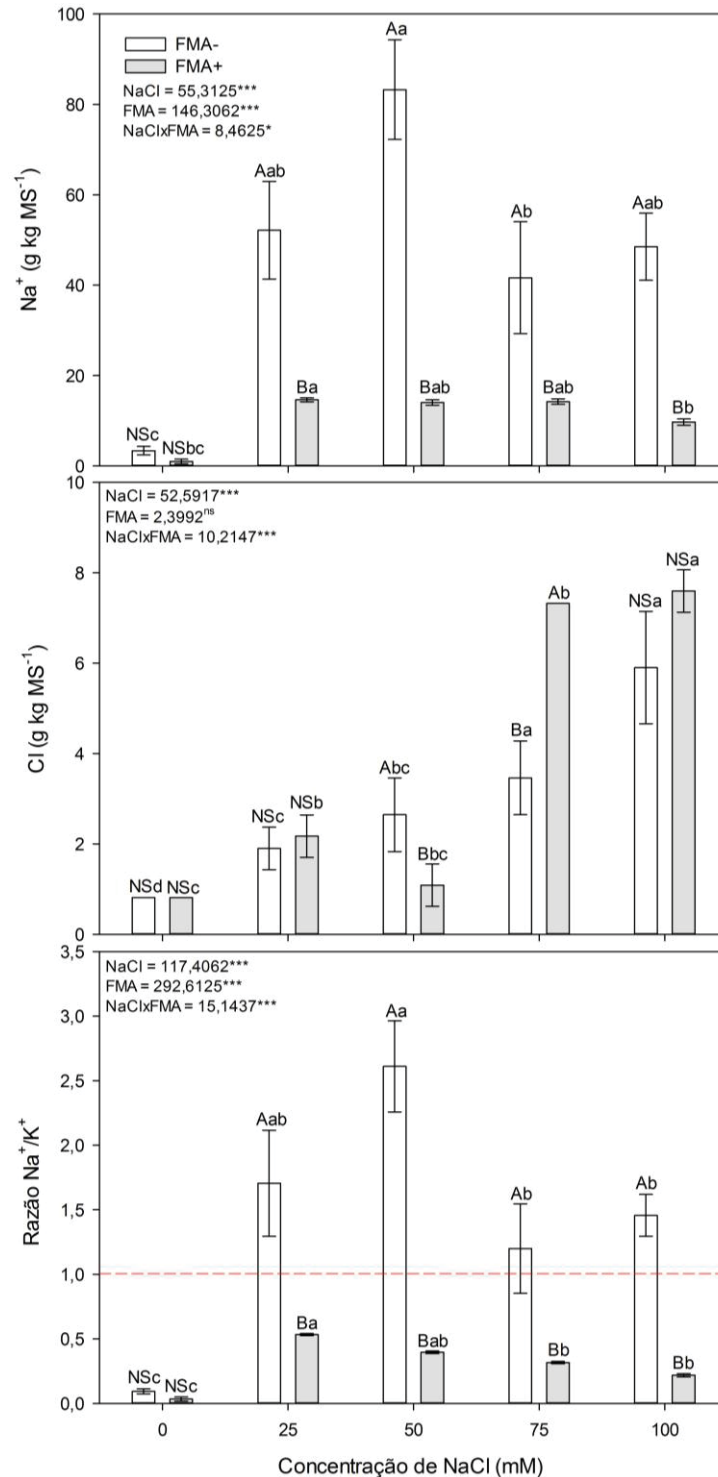
Concentrações de NaCl (Mm)	Cu		Fe		Mn		Zn	
			mg kg de massa seca <sup>-1</sup>					
	FMA-	FMA+	FMA-	FMA+	FMA-	FMA+	FMA-	FMA+
0	3,4 Bb	12,5 Aa	152,1 Bb	1227,7 Aa	83,6 NSc	75,4 NSa	39,4 NSb	33,7 NSc
25	8,7 Aa	5,9 Bc	148,4 Bb	255,6 Aab	135,2 Aa	81,9 Ba	33,6 NSbc	38,4 NSb
50	9,4 NSa	9,3 NSb	155,3 NSb	153,5 NSc	109,0 Ab	43,7 Bbc	30,8 Bc	38,1 Ab
75	9,9 Aa	7,9 Bb	146,8 Bb	178,3 Abc	102,2 Ab	56,8 Bb	52,7Aa	33,4 Bc
100	9,6 NSa	9,0 NSb	213,0 Aa	142,7 Bd	78,4 Ac	32,9 Bc	37,3 Bb	59,8 Aa

FONTE: O autor (2020)

### 3.3.6. Íons potencialmente tóxicos

O aumento da salinidade promoveu maior concentração de sódio e cloro em folhas de feijão-caupi, bem como aumento na razão sódio/potássio ( $\text{Na}^+/\text{K}^-$ ) para plantas FMA- e FMA+. Na presença de NaCl, a inoculação com *R. clarus* promoveu redução na concentração de  $\text{Na}^+$  e na razão  $\text{Na}^+/\text{K}^-$  em relação aos seus respectivos controles (FMA-) ( $P < 0,05$ ; Fig. 11).

Figura 11. Acúmulo de íons potencialmente tóxicos ( $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ) e Razão  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  em folhas de *V. unguiculata* cv. BRS Imponente expostas a concentrações crescentes de NaCl com e sem inoculação por *R. clarus*. Letras maiúsculas indicam diferença entre a inoculação (-FMA e +FMA) dentro das mesmas concentrações de NaCl (0, 25, 50, 75 e 100 mM), enquanto que letras minúsculas indicam diferença entre as concentrações de NaCl dentro da ausência (-FMA) e presença (+FMA) de inoculação, para interação significativa entre os fatores, comparados pelo teste de Tukey All pairs HSD ( $P < 0,05$ ). As barras significam média  $\pm$  DP de três repetições. \* e \*\*\* significativo a 5% e 0,1% respectivamente, <sup>ns</sup> não significativo. Linha vermelha tracejada indica o limiar de toxicidade para a razão  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ .



FONTE: O autor (2020)



### 3.4. DISCUSSÃO

O aumento potencial das áreas salinizadas tem sido uma consequência antrópica da má utilização dos recursos naturais e práticas agrícolas, atrelado ao incremento da temperatura terrestre devido às mudanças climáticas. Tal situação abrange a cada ano de 0,3 a 1,5 novos hectares de terras agricultáveis (KAPOOR et al., 2019). Neste trabalho foi investigado o potencial do fungo micorrízico (FMA) *Rhizophagus clarus* em atenuar o estresse salino em plantas de Feijão-caupi cv. BRS Imponente.

Mesmo sendo uma espécie com tolerância moderada a salinidade do solo, o feijão caupi pode apresentar sintomas danosos quando exposto a esta condição, que geralmente culminam em reduzida produtividade de biomassa e de grãos (MINI et al., 2019). Neste trabalho foi observado que em geral, as concentrações de NaCl superiores a 50 mM resultaram em decréscimo no acúmulo de biomassa fresca e seca, e também na produtividade de grãos (Tab. 3; Fig. 5). Tal comportamento é conhecido como uma consequência dos distúrbios osmóticos e iônicos impostos pelo sal (MARSCHNER, 1995). Entretanto, os efeitos deletérios no crescimento e produtividade da cultura foram atenuados pela inoculação micorrízica em plantas sob condições de salinidade menos excessivas (25 e 50 mM de NaCl).

Um dos possíveis motivos para o reduzido efeito positivo da inoculação em plantas submetidas às mais altas concentrações de NaCl pode ser a reduzida taxa de colonização das raízes pelo FMA nestas condições (Fig. 6). Diminuição da colonização micorrízica sob altas concentrações de sal é uma resposta recorrente (ABDEL-FATTAH et al., 2016; ABEER et al., 2015). O sal diminui a germinação dos esporos e do crescimento micelial, o que é refletido na formação e no desempenho da simbiose (EVELIN et al., 2009), podendo, portanto, diminuir o efeito benéfico do fungo em plantas sob condição de estresse.

Estresses abióticos como a salinidade podem desencadear diversas respostas nas plantas, como o aumento da atividade de sistemas de defesa a danos oxidativos e da produção de compostos relacionados a regulação osmótica (SILVEIRA et al., 2010). A síntese de altas concentrações de prolina, por exemplo, é uma resposta extremamente relacionada a fenômenos de salinidade e seca (JACOBY et al., 2011). Tal molécula pode atuar prevenindo o aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio, diminuindo assim danos oxidativos



(GHARSALLAH et al., 2016), bem como, pode atuar na regulação osmótica da planta e manutenção do balanço hídrico (SINGH et al., 2014). Evelin et al. (2009) reportam que o acúmulo de prolina é intensificado com a associação micorrízica, todavia, neste estudo não foi observado efeito significativo da inoculação sob o conteúdo de prolina, exceto na concentração 75 mM de NaCl.

Além da interferência nos processos metabólicos, a salinidade é conhecida por induzir alterações na anatomia e morfologia dos vegetais (MIRANSARI, 2017). Alterações na anatomia vegetal e distúrbios em diferentes estruturas celulares, como os cloroplastos (SUO et al., 2017), podem ter intenso impacto nas reações bioquímicas (MIRANSARI, 2017). Por isso, foi investigado o efeito da salinidade e do FMA na anatomia foliar. As dimensões do tecido foliar foram afetadas pela salinidade e pela associação micorrízica (Fig. 10), o incremento observado significa uma resposta comum das plantas ao estresse salino (LONGSTRETH; NOBEL, 1979), e pode estar relacionado a tentativa de diluição dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  no espaço celular (ACOSTA-MOTOS et al., 2017), bem como, ser uma resposta para compensar a perda da área fotossintética devido à senescência foliar e necroses causadas por estresses abióticos (TUFFI SANTOS et al., 2009). Entretanto, o aumento da espessura foliar pode representar uma barreira para difusão do  $\text{CO}_2$ , o que pode dificultar os processos fotossintéticos (LONGSTRETH; NOBEL, 1979). A associação micorrízica no entanto, não foi eficiente em contrapor este efeito, tal condição pode estar relacionada ao acúmulo de potássio (Tab. 3), visto que houve maior absorção deste nutriente nos tecidos foliares. Este nutriente apresenta papel osmorregulador, e é normalmente acumulado nos vacúolos promovendo assim uma extensão celular (MARSCHNER, 1995).

Além dos efeitos na microestrutura vegetal, outra resposta comum das glicófitas quanto a salinidade é o desbalanço nutricional. Desta forma, foi investigado o efeito da associação micorrízica e da salinidade no conteúdo de nutrientes. A associação micorrízica promoveu maior acúmulo de fósforo e potássio ( $[\text{NaCl}] \geq 50$  mM), porém acarretou em redução no conteúdo de magnésio (Tab. 4). O aporte de nutrientes é um dos principais efeitos benéficos decorrentes da associação micorrízica principalmente em condições salinas, pois a salinidade do solo pode afetar a absorção de fósforo, potássio e nitrogênio, três dos seis nutrientes necessários em maior quantidade para as plantas.

Em condições salinas o fósforo pode precipitar-se com cálcio e magnésio, e assim os três nutrientes se tornam indisponíveis para as plantas. Enquanto que o potássio é facilmente confundido pelo sódio, devido as suas características físico-químicas semelhantes (KAPOOR et al., 2019), o que diminui a absorção deste nutriente, e afeta o desenvolvimento vegetal. A deficiência em fósforo, potássio, e magnésio pode acarretar em danos a processos extremamente importantes para o desenvolvimento vegetal, como a geração e transferência de energia, metabolismo de carbono, fotossíntese, síntese de membranas, ativação de enzimas, regulação estomática, entre outros (MARSCHNER, 1995). Contudo, os FMAs desenvolveram diferentes formas de garantir o incremento de fósforo para as plantas, como a liberação de fosfatases pelas hifas fúngicas; expressão de genes transportadores de fosfato de alta afinidade (GvPT, GiPT e GmosPT) e formação e acúmulo de polifosfatos no interior das hifas (KAPOOR et al., 2019), bem como, de potássio por induzirem a expressão de transportadores de potássio de alta afinidade, e compartimentalização de sódio nos vacúolos (PORCEL et al., 2016).

É relatado que o aumento na concentração de sais pode diminuir a disponibilidade e mobilidade de micronutrientes, dificultando sua absorção pelas plantas (GHEYI et al., 2016). Todavia, a simbiose com *R. clarus* promoveu maior absorção de cobre (controle), ferro ([NaCl] 0 e 75 mM) e zinco ([NaCl] 50 e 100 mM) e reduziu o conteúdo de manganês em todas as concentrações salinas (Tab. 5), a menor absorção de manganês pode estar relacionada a menor exsudação das raízes quando estão associadas ao FMA, estes exsudatos seriam responsáveis por reduzir o Mn facilitando a sua absorção pela planta (POSTA et al., 1994).

O aumento das concentrações salinas no substrato promoveu maior absorção de sódio pelas plantas FMA- (Fig. 11). O maior aporte de sódio pode interromper a síntese proteica, atividade enzimática, fotossíntese, manutenção do turgor, movimento estomático e aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (KAPOOR et al., 2019). No entanto, a associação com o *R. clarus* (FMA+) proporcionou menores concentrações de  $\text{Na}^+$ , o que promoveu relação  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  abaixo de 1 (limiar de toxicidade) em folhas de caupi. Este fato está relacionado com a diminuição do estresse iônico (EVELIN et al., 2009). Todavia, a associação micorrízica não foi eficiente na regulação da absorção de cloro, e este íon potencialmente tóxico teve acúmulo nas folhas de plantas expostas as concentrações crescentes de NaCl (Fig. 11). Tal fato afeta ainda mais o balanço

nutricional da planta, visto que em concentrações elevadas, o cloro pode interferir na absorção de nitratos e no transporte de ácidos orgânicos dentro e entre as células vegetais, afetando também o crescimento da planta (GHEYI et al., 2016). Atrelado a isso, o menor conteúdo hídrico nos tecidos vegetais ( $\text{NaCl} > 50 \text{ mM}$ ) pode estar extremamente relacionado com a diminuição da massa fresca e seca da parte aérea de caupi, visto que diminuições no conteúdo de água acarretam em reduções de todos os mecanismos fisiológicos dependentes dela (GHEYI et al., 2016), refletindo inclusive na resposta da produtividade de grãos.

Estes resultados sugerem que a associação micorrízica pode afetar diferentemente o desenvolvimento vegetal de *V. unguiculata* cv. BRS Imponente, contudo, os efeitos positivos na diminuição do conteúdo de sódio e o incremento na produtividade na concentração 25 mM de NaCl representam ótimas respostas para indicar tal prática em solos salinos. De acordo com a ONU (2019) a taxa de crescimento da humanidade sobe 1,09 % a cada ano, e muito se é discutido sobre a importância do aumento da produção de alimentos e eficiência da distribuição na perspectiva do aumento da população atrelado aos impactos ambientais e redução das áreas agricultáveis. Desta forma a associação micorrízica representa uma prática de manejo promissora, para estimular a produção em meio às terras agrícolas em declínio, como em áreas salinizadas, a fim de promover a segurança alimentar.

### 3.5. CONCLUSÃO

O entendimento da influência de fatores bióticos e abióticos sob o desenvolvimento vegetal pode ser estudado por diversas óticas, o que demonstra o quão complexas estas interações podem ser. A simbiose entre *Rhizophagus clarus* e *Vigna unguiculata* cv. BRS Imponente promoveu respostas diferentes nos parâmetros estudados. Contudo os principais efeitos da associação micorrízica foram redução do estresse iônico, medido pelo menor conteúdo de sódio e da relação  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  nas folhas; melhor regulação do estado nutricional devido a maior absorção de fósforo e potássio e maior acúmulo de biomassa de folhas e produtividade de grãos. Desta forma a prática de inoculação de sementes de *V. unguiculata* com FMA pode trazer benefícios socioeconômicos e ambientais, sendo indicada para o cultivo de feijão-caupi cv. BRS Imponente em áreas salinizadas.

### 3.6. REFERÊNCIAS

- ABDEL-FATTAH, G. M.; RABIE, G. H.; LAMIS, D. S.; RABAB, A. M. The impact of the arbuscular mycorrhizal fungi on growth and physiological parameters of cowpea plants grown under salt conditions. **International Journal of Applied Sciences and Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 372–379, 2016.
- ABDULLAH, A. Y. M.; BISWAS, R. K.; CHOWDHURY, A. I.; BILLAH, S. M. Modeling soil salinity using direct and indirect measurement techniques : A comparative analysis. **Environmental Development**, v. 29, n. September 2017, p. 67–80, 2019. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envdev.2018.12.007>>.
- ABEER, H.; ABD\_ALLAH, E. F.; ALQARAWI, A. A.; EGAMBERDIEVA, D. Induction of salt stress tolerance in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] by arbuscular mycorrhizal fungi. **Legume Research**, v. 38, n. 5, p. 579–588, 2015.
- ACOSTA-MOTOS, J. R.; ORTUÑO, M. F.; BERNAL-VICENTE, A.; et al. Plant Responses to Salt Stress : **Adaptive Mechanisms. Agronomy**, v. 7, n. 18, p. 1–38, 2017.
- AGUIAR, T. V.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; AZEVEDO, A. A.; FERREIRA, R. S. Anati quanti: Software de análises quantitativas para estudos em anatomia vegetal. **Planta Daninha**, v. 25, n. 4, p. 649–659, 2007.
- BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, p. 205–207, 1973.
- DIONÍSIO, J. A.; PIMENTEL, I. C.; SIGNOR, D.; et al. **Guia prático de biologia do solo**. 1o ed. Curitiba - PR, Brasil: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo / Núcleo Estadual Paraná, 2016.
- ENYIUKWU, D.; AMADIOHA, A.; ONONUJU, C. Nutritional significance of cowpea leaves for human consumption. **Greener Trends in Food Science and Nutrition**, v. 1, n. 1, p. 1–10, 2018.
- EVELIN, H.; KAPOOR, R.; GIRI, B. Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress : a review. **Annals of Botany**, v. 104, p. 1263–1280, 2009.
- FAO. **Pulses for food security and nutrition: How can their full potential be tapped?**, 2016.
- FAO; ITPS. Status of the World's Soil Resources. **Journal of Genetics**, 2015.
- GHARSALLAH, C.; FAKHFAKH, H.; GRUBB, D.; GORSANE, F. Effect of salt stress on ion concentration, proline content, antioxidant enzyme activities and gene expression in tomato cultivars. **AoB Plants**, v. 8, p. 1–21, 2016.
- GHEYI, H. R.; DIAS, N. DA S.; LACERDA, C. F. DE; FILHO, E. G. **Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados**. 2016.

GOMES, M. P.; RICHARDI, V. SOBRINHO; BICALHO, E. MONTEZE; et al. Effects of Ciprofloxacin and Roundup on seed germination and root development of maize. **Science of the Total Environment**, v. 651, n. October 2018, p. 2671–2678, 2019.

GONÇALVES, A.; GOUFO, P.; BARROS, A.; et al. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp), a renewed multipurpose crop for a more sustainable agri-food system : nutritional advantages and constraints. January, 2016.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. Circular. **California Agricultural Experiment Station**, v. 347, n. 2, p. 32, 1950.

JACOBY, R. P.; TAYLOR, N. L.; MILLAR, A. H. The role of mitochondrial respiration in salinity tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 16, n. 11, p. 614–623, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2011.08.002>>.

JAMIL, A.; RIAZ, S.; ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Gene Expression Profiling of Plants under Salt Stress. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 30, n. 5, p. 435–458, 2011.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Company, INC, 1940.

KAPOOR, R.; EVELIN, H.; DEVI, T. S.; GUPTA, S. Mitigation of salinity stress in plants by arbuscular mycorrhizal symbiosis: current understanding and new challenges. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. 470, 2019.

LONGSTRETH, D. J.; NOBEL, P. S. Salinity Effects on Leaf Anatomy: Consequences for Photosynthesis. **Plant Physiology**, v. 63, p. 700–703, 1979.

MADEIRA, V.M.C., Antunes-Madeira, M.C., Carvalho, A.P., 1974. Activation energies of the ATPase activity of sarcoplasmic reticulum. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 58, 897-904.

MANAF, H. H.; ZAYED, M. S. Productivity of cowpea as affected by salt stress in presence of endomycorrhizae and *Pseudomonas fluorescens*. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 60, n. 2, p. 219–226, 2015. Faculty of Agriculture, Ain Shams University. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aoas.2015.10.013>>.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 1995.

MARTINS, A. P. L.; REISSMANN, C. B. Material vegetal e as rotinas laboratoriais nos procedimentos químico-analíticos. **Scientia Agraria**, v. 8, n. 1, p. 1–17, 2007.

MINI, M. L.; SATHYA, M.; ESSA, M. M.; et al. Identification of salt-tolerant cowpea genotypes using ISSR markers and proteome analysis. **Frontiers In Bioscience**, v. 11, p. 130–149, 2019.

MIRANSARI, M. Arbuscular mycorrhizal fungi and soil salinity. **Mycorrhizal Mediation of Soil**. p.263–277, 2017. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-804312-7.00015-2>>.

ONU. **World Population Prospects 2019**. 2019.

PORCEL, R.; AROCA, R.; AZCON, R.; RUIZ-LOZANO, J. M. Regulation of cation transporter genes by the arbuscular mycorrhizal symbiosis in rice plants subjected to salinity suggests improved salt tolerance due to reduced Na<sup>+</sup> root-to-shoot distribution. **Mycorrhiza**, 2016. Mycorrhiza. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00572-016-0704-5>>.

POSTA, K.; MARSCHNER, H.; RÖMHELD, V. Manganese reduction in the rhizosphere of mycorrhizal and nonmycorrhizal maize. **Mycorrhiza**, v. 5, p. 119–124, 1994.

SCHÜSSLER, A. Glomeromycota (version Oct 2017). In: Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2019 Annual Checklist (Roskov Y., Ower G., Orrell T., Nicolson D., Bailly N., Kirk P.M., Bourgoin T., DeWalt R.E., Decock W., Nieukerken E. van, Zarucchi J., Penev L., eds.).

SILVA, E. de B.; NOGUEIRA, F. D.; GUIMARÃES, P. T. G. **Análise de cloreto em tecido vegetal**. UFLA, p. 5–20, 1991.

SILVA, G. A. E.; SIQUEIRA, J. O.; STÜRMER, S. L.; MOREIRA, F. M. S. effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungal isolates from the land uses of amazon region in Symbiosis with Cowpea. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 1, p. 357–371, 2018.

SILVEIRA, J. A. G.; SILVA, S. L. F.; SILVA, E. N.; VIÉGAS, R. A. **Mecanismos biomoleculares envolvidos com a resistência ao estresse salino em plantas**. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade, 2010.

SINGH, M.; KUMAR, J.; SINGH, V. P.; PRASAD, S. M. **Proline and salinity tolerance in plants. biochemistry & pharmacology**, v. 3, n. 6, 2014.

SUO, J.; ZHAO, Q.; DAVID, L.; CHEN, S.; DAI, S. Salinity Response in Chloroplasts : Insights from Gene Characterization. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1011, p. 1–17, 2017.

TAGLIAFERRE, C.; GUIMARÃES, D. U. G.; GONÇALVES, L. J.; et al. **Produtividade e tolerância do feijão caupi ao estresse salino**. p. 168–179, 2018.

TUFFI SANTOS, L. D.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; MEIRA, R. M. S. A.; et al. Leaf anatomy and morphometry in three eucalypt clones treated with glyphosate. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 1, p. 129–136, 2009.



#### 4. CONCLUSÃO GERAL

A cultivar BRS Imponente de *Vigna unguiculata* se demonstrou tolerante a salinidade do solo até a concentração de 50 mM de NaCl (CE 5 dS m<sup>-1</sup>). Embora não tenha sido afetada na fase germinativa, a salinidade teve efeito pronunciado sob o desenvolvimento de plântulas em concentrações  $\geq 75$  mM de NaCl. Esse efeito negativo nas plântulas, afetam a cultura, uma vez que a qualidade das plântulas é limitada, ocasionando posteriormente redução na produtividade de grãos.

A associação com *Rhizophagus clarus* acarretou em redução do estresse iônico, medido pelo menor conteúdo de sódio e da relação Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> nas folhas; regulação do estado nutricional devido a maior absorção de fósforo e potássio e maior acúmulo de biomassa de folhas e produtividade de grãos. Desta forma a prática de inoculação de sementes de *Vigna unguiculata* com FMA pode trazer benefícios socioeconômicos e ambientais, sendo indicada para o cultivo de feijão-caupi cv. BRS Imponente em áreas salinizadas.

#### 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Novos estudos devem ser desenvolvidos buscando investigar o potencial de diferentes espécies de fungos atrelado a diferentes cultivares de Feijão-caupi, bem como outras espécies de grande importância alimentar, a fim de encontrar resultados ainda mais interessantes para o desenvolvimento agrícola frente ao continuo declínio das terras agricultáveis.



## 6. REFERÊNCIAS

- ABDEL-FATTAH, G. M.; RABIE, G. H.; LAMIS, D. S.; RABAB, A. M. THE IMPACT OF THE ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI ON GROWTH AND PHYSIOLOGICAL PARAMETERS OF COWPEA PLANTS GROWN UNDER SALT CONDITIONS. **International Journal of Applied Sciences and Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 372–379, 2016.
- ABDULLAH, A. Y. M.; BISWAS, R. K.; CHOWDHURY, A. I.; BILLAH, S. M. Modeling soil salinity using direct and indirect measurement techniques : A comparative analysis. **Environmental Development**, v. 29, n. September 2017, p. 67–80, 2019. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envdev.2018.12.007>>.
- ABEER, H.; ABD\_ALLAH, E. F.; ALQARAWI, A. A.; EGAMBERDIEVA, D. Induction of salt stress tolerance in cowpea [ *Vigna unguiculata* ( L .) Walp .] by arbuscular mycorrhizal fungi. **Legume Research**, v. 38, n. 5, p. 579–588, 2015.
- ACOSTA-MOTOS, J. R.; ORTUÑO, M. F.; BERNAL-VICENTE, A.; et al. Plant Responses to Salt Stress : Adaptive Mechanisms. **Agronomy**, v. 7, n. 18, p. 1–38, 2017.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984.
- AGUIAR, T. V.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; AZEVEDO, A. A.; FERREIRA, R. S. ANATI QUANTI : S SOFTWARE DE ANÁLISES QUANTITATIVAS PARA ESTUDOS EM ANATOMIA VEGETAL. **Planta Daninha**, v. 25, n. 4, p. 649–659, 2007.
- BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, v. 14, p. 93–107, 2004.
- BAILLY, C. The signalling role of ROS in the regulation of seed germination and dormancy. **Biochemical Journal**, v. 476, n. July, p. 3019–3032, 2019.
- BARROCA, M. V. **Determinação e conversão da condutividade elétrica do solo em função da composição da solução salina e umidade volumétrica do solo**, 2019. Universidade Federal do Paraná.
- BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, p. 205–207, 1973.
- BATISTA, N. A. S.; LUZ, P. B.; SOBRINHO, S. De P.; NEVES, L. G.; KRAUSE, W. Comunicação Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de feijão-caupi pelo teste de condutividade elétrica. **Revista Ceres**, v. 59, n. 4, p. 550–554, 2012.
- BEWLEY, D. J.; BLACK, M. **Seeds: Physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1994.
- BIANCHETTI, A.; AMARAL, E. Dia médio e velocidade de germinação de sementes de Cebola (*Allium cepa*, L.). **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 13, n. Brasil 1967, p. 33–44, 1978.
- BIRCH-MACHIN, M. A.; HOWELL, N.; TURNBULL, D. M. Identification of

- mitochondrial dysfunction at coupling site II. In: H. Lashand; D. P. Jones (Orgs.); **Methods in Toxicology**. p.324 – 328, 1993. San Diego: Academic Press.
- BIRCH-MACHIN, M. A.; JACKSON, S.; KLER, R. S.; TURNBULL, D. M. Study of skeletal muscle mitochondrial dysfunction. In: L. H. Lashand; D. P. Jones (Orgs.); **Methods in Toxicology**. p.58–59, 1993. San Diego: Academic Press.
- BLUMWALD, E. Sodium transport and salt tolerance in plants. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 12, p. 431–434, 2000.
- BORDE, M.; DUDHANE, M.; JITE, P. Growth photosynthetic activity and antioxidant responses of mycorrhizal and non-mycorrhizal bajra ( *Pennisetum glaucum* ) crop under salinity stress condition. **Crop Protection**, v. 30, n. 3, p. 265–271, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2010.12.010>>. .
- BOUKAR, O.; FATOKUN, C. A.; ROBERTS, P. A.; et al. **Cowpea**. New York: Springer Science, 2015.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 254, p. 248–254, 1976.
- BUSBY, P. E.; SOMAN, C.; WAGNER, M. R.; et al. Research priorities for harnessing plant microbiomes in sustainable agriculture. **PLOS Biology**, v. 15, n. 3, p. 1–14, 2017.
- COELHO, J. B. M.; BARROS, M. DE F. C.; BEZERRA NETO, E.; SOUZA, E. R. DE. Ponto de murcha permanente fisiológico e potencial osmótico de feijão caupi cultivado em solos salinizados. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 7, p. 708–713, 2014. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-43662014000700006&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-43662014000700006&lng=pt&tlng=pt)>. .
- DIAS, A. S.; NOBRE, R. G.; LIMA, G. S. DE; GHEYI, H. R.; PINHEIRO, F. W. A. Crescimento e produção de algodoeiro de fibra colorida cultivado em solo salino-sódico e adubação orgânica. **Irriga**, p. 260–273, 2016.
- DIONÍSIO, JAIR ALVES; PIMENTEL, I. C.; SIGNOR, D.; et al. **Guia prático de biologia do solo**. 1º ed. Curitiba - PR, Brasil: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo / Núcleo Estadual Paraná, 2016.
- EL-MAAROUF-BOUTEAU, H.; BAILLY, C. Oxidative signaling in seed germination and dormancy. **Plant Signaling & Behavior**, , n. March, p. 175–182, 2008.
- ENYIUKWU, D.; AMADIOHA, A.; ONONUJU, C. Nutritional Significance of Cowpea Leaves for Human Consumption. **Greener Trends in Food Science and Nutrition**, v. 1, n. 1, p. 1–10, 2018.
- ESTORNELL, E.; FATO, R.; PALLOTTI, F.; LENAIZ, G. Assay conditions for the mitochondrial NADH : coenzyme Q oxidoreductase. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 332, n. 1,2, p. 127–131, 1993.
- ESTRADA, B.; AROCA, R.; BAREA, J. M.; RUIZ-LOZANO, J. M. Native arbuscular mycorrhizal fungi isolated from a saline habitat improved maize antioxidant systems and plant tolerance to salinity. **Plant Science**, v. 201–202, p. 42–51, 2013. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.11.009>>. .
- EVELIN, H.; KAPOOR, R.; GIRI, B. Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress : a review. **Annals of Botany**, v. 104, p. 1263–1280, 2009.
- FAO. Pulses for food security and nutrition: How can their full potential be tapped? , 2016.
- FAO; ITPS. Status of the World's Soil Resources. **Journal of Genetics**, 2015.
- FAROOQ, M.; GOGOI, N.; HUSSAIN, M.; et al. Plant Physiology and Biochemistry Effects , tolerance mechanisms and management of salt stress in grain legumes.

- Plant Physiology et Biochemistry**, v. 118, p. 199–217, 2017. Elsevier Masson SAS. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.06.020>>. .
- FERNANDES, J. D.; CHAVES, L. H. G.; MENDES, J. S.; CHAVES, I. B.; TITO, G. A. Alterations in soil salinity with the use of different biochar doses. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 42, n. 1, p. 89–98, 2019.
- FREIRE, M. B. G. S.; MIRANDA, M. F. A.; OLIVEIRA, E. E. M.; et al. Agrupamento de Solos Quanto à Salinidade no Perímetro Irrigado de Custódia. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. January, p. s86–s91, 2014.
- GAO, Y.; YOUNG, L.; BONHAM-SMITH, P.; GUSTA, L. V. Characterization and expression of plasma and tonoplast membrane aquaporins in primed seed of *Brassica napus* during germination under stress conditions. **Plant Molecular Biology**, v. 40, p. 635–644, 1999.
- GHARSALLAH, C.; FAKHFAKH, H.; GRUBB, D.; GORSANE, F. Effect of salt stress on ion concentration, proline content, antioxidant enzyme activities and gene expression in tomato cultivars. **AoB Plants**, v. 8, p. 1–21, 2016.
- GHEYI, H. R.; DIAS, N. DA S.; LACERDA, C. F. DE; FILHO, E. G. **Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados**. 2016.
- GOMES, M. P.; CARNEIRO, M. M. L. C.; NOGUEIRA, C. O. G.; SOARES, A. M.; GARCIA, Q. S. The system modulating ROS content in germinating seeds of two Brazilian savanna tree species exposed to As and Zn. **Acta Physiol Plant**, v. 35, p. 1011–1022, 2013.
- GOMES, M. P.; GARCIA, Q. S. Reactive oxygen species and seed germination. **Biologia**, v. 68, n. 3, p. 351–357, 2013.
- GOMES, M. P.; RICHARDI, V. SOBRINHO; BICALHO, E. MONTEZE; et al. Effects of Ciprofloxacin and Roundup on seed germination and root development of maize. **Science of the Total Environment**, v. 651, n. October 2018, p. 2671–2678, 2019.
- GOMES, M. PEDROSA; CRUZ, F. VIEIRA DA SILVA; BORGES, F. VIEGAS; FONSECA, M. BACELAR; GARCIA, Q. SIUZA. Modulation of *Dimorphandra wilsonii* Rizz . seed germination through H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> production in response to Zn interference of the mitochondrial electron transport chain. **Environmental and Experimental Botany**, v. 128, p. 51–58, 2016. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.04.003>>. .
- GONÇALVES, A.; GOUFO, P.; BARROS, A.; et al. Cowpea ( *Vigna unguiculata* L . Walp ), a renewed multipurpose crop for a more sustainable agri-food system : nutritional advantages and constraints. , , n. January, 2016.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **Circular. California Agricultural Experiment Station**, v. 347, n. 2, p. 32, 1950.
- HODGES, D. M.; ANDREWS, C. J.; JOHNSON, D. A.; HAMILTON, R. I. Antioxidant compound responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines. **Physiologia Plantarum**, v. 98, p. 685–692, 1996.
- JACOBY, R. P.; TAYLOR, N. L.; MILLAR, A. H. The role of mitochondrial respiration in salinity tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 16, n. 11, p. 614–623, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2011.08.002>>. .
- JAMIL, A.; RIAZ, S.; ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Gene Expression Profiling of Plants under Salt Stress. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 30, n. 5, p. 435–458, 2011.
- JENNER, H. L.; WINNING, B. M.; MILLAR, A. H.; et al. NAD Malic Enzyme and the Control of Carbohydrate Metabolism in Potato Tubers. **Plant Physiology**, v. 126, n. 1139–1149, 2001.

- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Company, INC, 1940.
- JOSÉ, A. C.; SILVA, N. C. N.; FARIA, JOSÉ MARCIO ROCHA; PEREIRA, WILSON VICENTE SOUZA. Influence of priming on *Eucalyptus* spp seeds' tolerance to salt stress. **Journal of Seed Science**, v. 38, n. 4, p. 329–334, 2016.
- KAPOOR, R.; EVELIN, H.; DEVI, T. S.; GUPTA, S. Mitigation of salinity stress in plants by arbuscular mycorrhizal symbiosis: current understanding and new challenges. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. 470, 2019.
- KATEMBE, W.; UNGAR, IRWIN A.; MITCHELL, JHON P. Effect of Salinity on Germination and Seedling Growth of two *Atriplex* species ( *Chenopodiaceae* ). **Annals of Botany**, v. 82, p. 167–175, 1998.
- KSHETRIMAYUM, E.; SAHOO, D. P.; MITRA, J.; PANDA, S. K. Regulation of Seed Germination and the Role of Aquaporins under Abiotic Stress. **International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 607–615, 2017.
- LONGSTRETH, D. J.; NOBEL, P. S. Salinity Effects on Leaf Anatomy: Consequences for Photosynthesis. **Plant Physiology**, v. 63, p. 700–703, 1979.
- MA, W.; GUAN, X.; LI, J.; et al. Mitochondrial small heat shock protein mediates seed germination via thermal sensing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 1, p. 1–6, 2019.
- MADEIRA, V. M. C.; ANTUNES-MADEIRA, M. C.; CARVALHO, A. P. Activation energies of the ATPase activity of sarcoplasmic reticulum. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 58, p. 897– 904., 1974.
- MAIA, J. M.; FERREIRA-SILVA, S. L.; VOIGT, E. L.; et al. Activities of antioxidant enzymes and root growth inhibition in cowpea seedlings exposed to different salt levels. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 2, p. 342–349, 2012.
- MANAF, H. H.; ZAYED, M. S. Productivity of cowpea as affected by salt stress in presence of endomycorrhizae and *Pseudomonas fluorescens*. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 60, n. 2, p. 219–226, 2015. Faculty of Agriculture, Ain Shams University. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aos.2015.10.013>>. .
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 1995.
- MARTINS, A. P. L.; REISSMANN, C. B. Material vegetal e as rotinas laboratoriais nos procedimentos químico-analíticos. **Scientia Agraria**, v. 8, n. 1, p. 1–17, 2007.
- MINI, M. L.; SATHYA, M.; ESSA, M. M.; et al. Identification of salt-tolerant cowpea genotypes using ISSR markers and proteome analysis. **Frontiers In Bioscience**, v. 11, p. 130–149, 2019.
- MIRANSARI, M. Arbuscular mycorrhizal fungi and soil salinity. **Mycorrhizal Mediation of Soil**. p.263–277, 2017. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-804312-7.00015-2>>. .
- MORAIS, M. A. DOS S.; JARDIM, A. M. DA R. F.; OLIVEIRA, E. N. DE; et al. O NaCl inie a germinação e a atividade da amilase em duas espécies de feijão. **Revista Nordestia de Ciências Biológicas**, v. 01, n. April, p. 50–56, 2018.
- MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 239–250, 2002.
- MUNNS R. Tansley review: genes and salt tolerance: bringing them together. **New Phytologist**, Cambridge, v.167, p. 645–663, 2005. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01487.x>

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of Salinity Tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, n. 1, p. 651–681, 2008. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>>. .

NABI, F.; CHAKER-HADDADJ, A.; TELLAH, S.; et al. Evaluation of Algerian Cowpea genotypes for salt tolerance at germination stage. **Advances in Environmental Biology**, v. 11, n. May, p. 79–88, 2017.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. **Plant e cell physiol**, v. 22, n. May, p. 867–880, 1981.

OLIVEIRA, W. J. DE; SOUZA, E. R. DE; SANTOS, H. R. B.; et al. FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA COMO INDICADOR DE ESTRESSE SALINO. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, v. 12, n. 3, p. 2592–2603, 2018.

ORDOÑES, Y. M.; FERNANDEZ, B. R.; LARA, L. S.; et al. Bacteria with Phosphate Solubilizing Capacity Alter Mycorrhizal Fungal Growth Both Inside and Outside the Root and in the Presence of Native Microbial Communities. **PLOS One**, v. 11, n. 6, p. 1–18, 2016.

ORTIZ-ESPÍN, A.; IGLESIAS-FERNÁNDEZ, R.; CALDERÓN, A.; CARBONERO, P.; SEVILLA, F. Mitochondrial AtTrxo1 is transcriptionally regulated by AtbZIP9 and AtAZF2 and affects seed germination under saline conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 5, p. 1025–1038, 2017.

PEREIRA, EDNÂNGELO DUARTE; MARINHO, A. BARBOSA; RAMOS, ELÍSIA GOMES; et al. Saline stress effect on cowpea beans growth under biofertilizer correction. **Bioscience Journal**, v. 35, n. 5, p. 1328–1338, 2019.

PEREIRA, T. S.; LIMA, M. D. R.; PAULA, L. S.; LOBATO, A. K. S. Tolerance to water deficit in cowpea populations resulting from breeding program: detection by gas exchange and chlorophyll fluorescence. **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 21, n. 2, p. 171–178, 2016.

PORCEL, R.; AROCA, R.; AZCON, R.; RUIZ-LOZANO, J. M. Regulation of cation transporter genes by the arbuscular mycorrhizal symbiosis in rice plants subjected to salinity suggests improved salt tolerance due to reduced Na + root-to-shoot distribution. **Mycorrhiza**, 2016. Mycorrhiza. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00572-016-0704-5>>. .

POSTA, K.; MARSCHNER, H.; RÖMHELD, V. Manganese reduction in the rhizosphere of mycorrhizal and nonmycorrhizal maize. **Mycorrhiza**, v. 5, p. 119–124, 1994.

PRASAD, M. N. V.; FREITAS, H.; FRAENZLE, S.; WUENSCHMANN, S.; MARKERT, B. Knowledge Explosion in Phytotechnologies for Environmental Solutions. **Environmental Pollution**, v. 158, n. 1, p. 18–23, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2009.07.038>>.



RAVELOMBOLA, W. S.; SHI, A.; WENG, Y.; CLARK, J. Evaluation of Salt Tolerance at Germination Stage in Cowpea [ *Vigna unguiculata* ( L .) Walp ]. **Hort Science**, v. 52, n. 9, p. 1168–1176, 2017.

SILVA, ENILSON DE BARROS; NOGUEIRA, FRANCISCO DIAS; GUIMARÃES, PAULO TÁCITO GONTIJO. Análise de cloreto em tecido vegetal. **UFLA**, p. 5–20, 1991.

SILVA, G. A. E.; SIQUEIRA, J. O.; STÜRMER, S. L.; MOREIRA, F. M. S. Effectiveness of Arbuscular Mycorrhizal Fungal Isolates from the Land Uses of Amazon Region in Symbiosis with Cowpea. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 1, p. 357–371, 2018.

SILVEIRA, J. A. G.; SILVA, S. L. F.; SILVA, E. N.; VIÉGAS, R. A. Mecanismos biomoleculares envolvidos com a resistência ao estresse salino em plantas. **Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade**, 2010.

SINGH, M.; KUMAR, J.; SINGH, V. P.; PRASAD, S. M. Proline and Salinity Tolerance in Plants. **Biochemistry & Pharmacology**, v. 3, n. 6, 2014.

SUO, J.; ZHAO, Q.; DAVID, L.; CHEN, S.; DAI, S. Salinity Response in Chloroplasts : Insights from Gene Characterization. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1011, p. 1–17, 2017.

TAGLIAFERRE, C.; GUIMARÃES, D. U. G.; GONÇALVES, L. J.; et al. PRODUTIVIDADE E TOLERÂNCIA DO FEIJÃO CAUPI AO ESTRESSE SALINO. , p. 168–179, 2018.

TAYLOR, A. G.; ALLEN, P. S.; BENNETT, M. A.; et al. Seed enhancements. **Seed Science Research**, v. 8, n. May, p. 245–256, 1998.

TUFFI SANTOS, L. D.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; MEIRA, R. M. S. A.; et al. Leaf anatomy and morphometry in three eucalypt clones treated with glyphosate. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 1, p. 129–136, 2009.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants Protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, v. 151, p. 59–66, 2000.

VILLELA, F. A.; FILHO, L. D.; SEQUEIRA, E. L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de Polietileno glicol 6000 e da temperatura. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 26, p. 1957–1968, 1991.

WU, N.; LI, Z.; LIU, H.; TANG, M. Influence of arbuscular mycorrhiza on photosynthesis and water status of *Populus cathayana* Rehder males and females under salt stress. **Acta Physiol Plant**, v. 37, n. 183, p. 1–14, 2015.

WU, Q. S.; ZOU, Y. N.; LIU, W.; et al. Alleviation of salt stress in citrus seedlings inoculated with mycorrhiza : changes in leaf antioxidant defense systems. **Plant Soil Environmental**, v. 56, n. 10, p. 470–475, 2010.

YAMASHITA, O. M.; NETO, E. F.; CAMPOS, O. R.; GUIMARÃES, S. C. Fatores que afetam a germinação de sementes e emergência de plântulas de arruda ( *Ruta graveolens* L .). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 11, n. 2, p. 202–208, 2009.

YANG, J. Y.; ZHENG, W.; TIAN, Y.; WU, Y.; ZHOU, D. W. Effects of various mixed salt-alkaline stresses on growth , photosynthesis , and photosynthetic pigment concentrations of *Medicago ruthenica* seedlings. **Photosynthetica**, v. 49, n. 2, p. 275–284, 2011.

YEO, A. R. Salinity resistance : Physiologies and prices. **Physiologia Plantarum**, v. 58, p. 214–222, 1983.